



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

BRÍGIDA DE ALMEIDA AMORIM SPAGNOL

**INFLUÊNCIA MITOCONDRIAL NA REGULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM
ENVELHECIMENTO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMETIDAS A
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

VITÓRIA, ES
2020

BRÍGIDA DE ALMEIDA AMORIM SPAGNOL

**INFLUÊNCIA MITOCONDRIAL NA REGULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM
ENVELHECIMENTO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMETIDAS A
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a Patricia Machado Bueno Fernandes

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S732i Spagnol, Brígida de Almeida Amorim, 1980-
Influência mitocondrial na regulação de genes envolvidos com envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à alta pressão hidrostática / Brígida de Almeida Amorim Spagnol. - 2020.
115 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Biologia Molecular. 3. Bioquímica. 4. Metabolismo Energético. 5. Genoma - Pesquisa. 6. Envelhecimento - Aspectos Moleculares. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

BRÍGIDA DE ALMEIDA AMORIM SPAGNOL

INFLUÊNCIA MITOCONDRIAL NA REGULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM ENVELHECIMENTO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMETIDAS À ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Apresentado em 07 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo.

Prof^a. Dr^a. Monica Montero Lomeli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA, ES
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir mais esta conquista. A minha orientadora prof^a. Patricia M. Bueno Fernandes e ao prof^o. Antonio Alberto R. Fernandes pela confiança, paciência e conhecimentos compartilhados nessa trajetória acadêmica.

Aos professores Alexandre Martins, Monica Montero, Nadja Cristhina e Fernando Araripe por aceitarem o convite à participação dessa banca de defesa e por dedicarem seu tempo às correções deste trabalho.

Ao meu esposo Rodrigo M. Spagnol, pela paciência, companheirismo e carinho nos momentos mais difíceis. A minha mãe Marina e minha irmã Talita por toda força e apoio. Ao meu querido pai Râmiton e meu querido padrasto Paulo (*in memoriam*) que infelizmente não estão mais entre nós, mas com certeza estariam muito felizes com mais essa vitória.

Aos colegas do LBAA, os quais contribuíram com trocas de conhecimentos e experiências. Em especial aos pós-doutores Tathiana F. Sá Antunes, Oeber Quadros e Flávia Pimentel pela prontidão e contribuição nesse processo de crescimento acadêmico.

Aos colegas de trabalho que apoiaram e me deram força nos momentos em que o cansaço se fez notório. Ao CIS/UFES (Comissão Interna de Supervisão da Carreira da UFES) e a superintendente do HUCAM e professora da UFES, prof^a Rita Elizabeth Checon por autorizar meu afastamento para a execução final deste trabalho.

Gratidão a todos, pois além do crescimento intelectual, estes seis anos que passei no LBAA me trouxeram também amadurecimento pessoal.

As agências de fomento, FINEP, CNPq, CAPES, FAPES pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SPAGNOL, B.A.A. **Influência mitocondrial na regulação de genes envolvidos com envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à alta pressão hidrostática.** 2020. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFES, Espírito Santo. Brasil.

Saccharomyces cerevisiae é um modelo de organismo eucarionte bem aceito para estudos sobre resposta ao estresse e envelhecimento, pois preservam diversos mecanismos bioquímicos, moleculares e de funcionamento de organelas. A mitocôndria é uma organela envolvida com resposta ao estresse e, por ser a principal geradora de espécies reativas de oxigênio (ROS) está fortemente implicada com o envelhecimento. O mal funcionamento dessa organela tem sido associado com o surgimento de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e com o câncer. Células maduras e jovens de *S. cerevisiae* respondem diferentemente ao estresse de alta pressão hidrostática (HHP). A maturidade celular favorece a regulação de genes envolvidos com o envelhecimento, aumentando em quase três vezes a resistência à HHP destas células em relação às células jovens. Genes reguladores do envelhecimento como TOR1, RAS2 e SCH9 têm sido implicados com disfunções mitocondriais. No entanto, é possível que as mitocôndrias influenciem a regulação de genes relacionados com envelhecimento. Assim, este trabalho buscou modular a regulação de TOR1, RAS2 e SCH9 através da inibição do aumento do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *S. cerevisiae* submetidas à HHP. Para alcançar esses objetivos, células mães de *S. cerevisiae* foram diferenciadas das células filhas pela impregnação de calcofluor white em sua parede celular, gerando células filhas sem impregnação. Assim, o acúmulo de ROS e o $\Delta\Psi_m$ em resposta à HHP puderam ser quantificados por citometria de fluxo. O ácido protocatecuico (PCA) foi previamente utilizado para proteção mitocondrial contra os efeitos desfavoráveis da HHP. Imagens de microscopia de fluorescência em células marcadas com mitotracker green-FM foram realizadas para observação da dinâmica mitocondrial. Por fim, genes envolvidos com o envelhecimento e defesas antioxidantes foram analisados por PCR em tempo real na população geral. Células mães e filhas indicaram semelhanças no $\Delta\Psi_m$ mediante os tratamentos aplicados. O estresse brando de HHP indicou indução do aumento do $\Delta\Psi_m$ e notamos que 15 min de recuperação em pressão ambiente

são necessários para a indicativa estabilização do $\Delta\Psi_m$ antes do tratamento severo de HHP. A proteção mitocondrial indicou redução do $\Delta\Psi_m$ e isto parece ter melhorado a tolerância ao tratamento severo. Células maduras acumularam altos níveis de ROS após à HHP. No entanto, a proteção mitocondrial junto a ação antioxidante do PCA reduziu o acúmulo de ROS nestas células, compensando a inibição da regulação dos genes antioxidantes. Quase todas as células com proteção mitocondrial resistiram ao estresse severo de HHP. Houve um aumento de 71% para 92% na tolerância ao estresse de HHP com prévia proteção mitocondrial. Os genes TOR1, RAS2 e SCH9 foram reprimidos, favorecendo a resposta ao estresse, aumentando a resistência. Além disso, a redução do acúmulo de ROS retardou o envelhecimento.

Palavras-chave: leveduras, tolerância ao estresse, mitocôndrias, antioxidantes, envelhecimento.

MITOCHONDRIAL INFLUENCE ON THE REGULATION OF GENES INVOLVED WITH AGING IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMITTED TO HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

SPAGNOL, B.A.A. **Mitochondrial influence in the gene regulation involved with aging in *Saccharomyces cerevisiae* submitted high hydrostatic pressure.** 2020. 106 p. Thesis (PhD Thesis in Biotechnology) – Biotechnology Graduate Program. UFES, Espírito Santo. Brazil.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is a well-accepted eukaryotic model organism for studies on stress response and aging, whereas preserves several biochemical, molecular and organelle functioning mechanisms. Mitochondria is an organelle involved with stress response and, because it is main generator of reactive oxygen species (ROS) is strongly implicated with aging. Dysfunctionalities of this organelle has been associated with neurodegenerative, psychiatric, and cancer diseases. Mature and young *S. cerevisiae* cells respond differently to high hydrostatic pressure (HHP) stress. Cell maturity favors genes regulation involved with aging, increasing by almost three times the HHP stress resistance of these cells compared to young cells. Aging regulatory genes such as TOR1, RAS2 and SCH9 have been implicated with mitochondrial dysfunctions. However, it is possible that mitochondria influence the aging-related genes regulation. Thus, this work sought to modulate the TOR1, RAS2 and SCH9 regulation by controlling the increase in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of *S. cerevisiae* submitted to HHP. To achieve these goals, *S. cerevisiae* mother cells were differentiated from daughter cells by Calcofluor White impregnation into their cell wall, generating daughter cells without impregnation. Thus, ROS accumulation and $\Delta\Psi_m$ in response to HHP was quantified by flow cytometry. Protocatechuic acid (PCA) was previously used for mitochondrial protection against the HHP unfavorable effects. Fluorescence microscopy images on mitotracker green-FM labeled cells were performed to observe mitochondrial dynamics. Finally, genes involved with aging and antioxidant defenses were analyzed by real-time PCR (qRT-PCR) in the general population. Mother and daughter cells indicated similarities in

$\Delta\Psi_m$ upon the applied treatments. Mild HHP stress indicated $\Delta\Psi_m$ increased and 15 min recovery at ambient pressure are required for $\Delta\Psi_m$ stabilization before severe HHP treatment. Mitochondrial protection indicated reducing of $\Delta\Psi_m$ and this seems to have improved the tolerance to severe treatment. Mature cells accumulated high levels of ROS after HHP. However, mitochondrial protection together with the PCA antioxidant action reduced the ROS accumulation in these cells, compensating the inhibition of antioxidant genes regulation. Almost all cells with mitochondrial protection resisted to severe HHP stress. There was a 71% to 92% increase in HHP stress tolerance with previous mitochondrial protection. The genes TOR1, RAS2 and SCH9 were repressed, favoring the stress response, increasing the resistance. In addition, reducing ROS accumulation has retarded aging.

Key words: yeast, stress tolerance, mitochondria, antioxidants, aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais características típicas de uma célula de <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 2: Representação de um equipamento de alta pressão hidrostática (HHP)	19
Figura 3: Representação da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria.....	22
Figura 4: Esquema da dinâmica mitocondrial	24
Figura 5: Esquema da estrutura molecular do ácido protocatecuico.....	27
Capítulo 1	42
Figure 1: HHP survival of <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 cells.	51
Figure 2: Reactive Oxygen Species accumulation in mother and daughter cells submitted to HHP	53
Figure 3: Relative expression of mother and daughter cells after HHP	55
Capítulo 2	66
Figura 1: Identificação de células mães e filhas por citometria de fluxo	78
Figura 2: Representação de mitocôndrias despolarizadas e energizadas.	79
Figura 3: Representação do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo	80
Figura 4: Tolerância de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 ao estresse de HHP	81
Figura 5: Produção de ROS em <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetidas à HHP	83
Figura 6: Produção de ROS em <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetidas à HHP após proteção mitocondrial (PM).....	85
Figura 7: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetidas à HHP	88
Figura 8: Figura ilustrativa da interação entre o retículo endoplasmático (RE) e a mitocôndria na ativação da cascata apoptótica	91
Figura 9: $\Delta\Psi_m$ em <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetidas à HHP após PM com PCA ...	93
Figura 10: Expressão relativa de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetida à HHP	101
Figura 11: Expressão relativa de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetida à HHP após PM.....	101

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1: Diferenciação de células mães e filhas por fluorescência com Calcoflúor White	78
Imagem 2: Imagem de microscopia de fluorescência de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetida à HHP	89
Imagem 3: Imagens de microscopia de fluorescência em <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 submetida à HHP após PM.....	94
Imagem 4: Imagens de microscopia de fluorescência de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 corada com Mitotracker Green-FM.....	97
Imagem 5: Imagens de microscopia de fluorescência de <i>S. cerevisiae</i> UCC5181 corada com Mitotracker Green-FM.....	99

LISTA DE SIGLAS

- $\Delta\Psi_m$** – potencial de membrana mitocondrial
- cAMP** – adenosina monofostato cíclico
- cDNA** – DNA codificador
- rDNA** – sequência de DNA codificador de RNA ribossomal
- CTT1** – catalase citosólica 1 (do inglês *Cytosolic catalase T1*)
- CTE** – cadeia transportadora de elétrons
- FSC** – dispersão adiante (do inglês *forward scatter*)
- GDP** – guanosina difosfato (do inglês *Guanosine diphosphate*)
- GTP** – guanosina trifosfato (do inglês *Guanosine triphosphate*)
- HAP1** – proteína ativadora heme (do inglês *Heme Activator Protein*)
- HHP** – alta pressão hidrostática (do inglês *High Hydrostatic Pressure*)
- MMI** – membrana mitocondrial interna
- MPa** – megapascal
- MRE** – mecanismos de resposta ao estresse
- mTOR** - alvo mecanicista da rapamicina (do inglês *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*)
- mtDNA** – DNA mitocondrial
- PCA** – ácido protocatecuico (do inglês *Protocatechuic acid*)
- PKA** – proteína quinase A (do inglês *Protein Kinase A*)
- PM** – proteção mitocondrial
- NAD⁺** - dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado) (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*)
- NADH** – NAD reduzido
- PBS** – tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate-buffered saline*)
- PTP** – poro de transição de permeabilidade
- qRT-PCR** – reação em cadeia de polimerase em tempo real (do inglês *polymerase chain reaction*)
- RAS2** – proteína ligante de GTP (*GTP-binding protein*)
- RE** – retículo endoplasmático
- ROS** – espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)
- RQ** – expressão relativa (do inglês *relative expression*)
- SGS1** – supressor de crescimento lento (do inglês *Slow Growth Suppressor*)

SIR2 – regulador de informação de silenciamento (do inglês *Silent Information Regulator*)

SOD2 – superóxido dismutase 2 (do inglês *SuperOxide Dismutase 2*)

SSC – dispersão lateral (do inglês *side scatter*)

TCA – ácido tricarbóxico (do inglês *tricarboxylic acid*)

TOR1 – alvo da rapamicina (*target of rapamycin*)

ufc – unidades formadoras de colônia

YEPD – extrato de levedura peptona e dextrose (do inglês *yeast extract peptone dextrose*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO MODELO DE ESTUDO	15
1.2 O ESTRESSE OXIDATIVO E A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	17
1.3 A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (HHP)	18
1.4 A MITOCÔNDRIA	20
1.5 DINÂMICA MITOCONDRIAL NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO	23
1.6 O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E CONSEQUÊNCIAS DISFUNCIONAIS	25
1.7 O ÁCIDO PROTOCATECUICO: UM PROTETOR DE MITOCÔNDRIAS	26
1.8 GENES ENVOLVIDOS COM ENVELHECIMENTO, LONGEVIDADE E RESPOSTA AO ESTRESSE.....	27
2 HIPÓTESE	31
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
REFERÊNCIA	34
5 CAPÍTULO 1: DIFFERENCES IN GENE MODULATION IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> INDICATE THAT MATURITY PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE HIGH HYDROSTATIC PRESSURE STRESS RESPONSE AND RESISTANCE	42
5.1 INTRODUCTION.....	44
5.2 MATERIAL AND METHODS.....	46
5.2.1 YEAST STRAINS AND GROWTH CONDITIONS	46
5.2.2 STRESS CONDITION.....	46
5.2.3. PURIFICATION OF MOTHER CELLS.....	46
5.2.4 GENE EXPRESSION CONFIRMATION BY REAL TIME RT-PCR	47
5.2.5 MEASUREMENT OF ENDOGENOUS REACTIVE OXYGEN ESPECIES (ROS)	50
RESULTS AND DISCUSSION	51
5.3.1 MATURITY INFLUENCES THE SURVIVAL OF <i>S. CEREVISIAE</i> UCC5181 STRAIN TO HHP.....	51

5.3.2 ROS PRODUCTION AFTER HHP TREATMENT	53
5.3.3 GENE EXPRESSION AFTER HHP TREATMENT	55
5.4 CONCLUSIONS.....	61
REFERENCES.....	63
6 CAPÍTULO 2: FUNCIONAMENTO MITOCONDRIAL AFETA A REGULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM O ENVELHECIMENTO EM <i>S. CEREVISIAE</i> SUBMETIDA À ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	67
6.1 INTRODUÇÃO	72
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
6.2.1 CEPAS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	74
6.2.2 CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	74
6.2.3 PCR EM TEMPO REAL	75
6.2.4 MARCADORES FLUORESCENTES	77
6.2.4.1 Acúmulo de ROS	77
6.2.4.2 Indicador de variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	79
6.2.5 ANÁLISE DA DINÂMICA MITOCONDRIAL	80
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
6.3.1 TOLERÂNCIA DE <i>S. CEREVISIAE</i> COM PROTEÇÃO MITOCONDRIAL AO ESTRESSE DE HHP.....	81
6.3.2 PRODUÇÃO DE ROS EM <i>S. CEREVISIAE</i> SUBMETIDA À HHP	83
6.3.2.1 Produção de ROS em <i>S. cerevisiae</i> submetidas à HHP	83
6.3.2.2 Produção de ROS em <i>S. cerevisiae</i> com proteção mitocondrial submetida à HHP	84
6.3.3 Indicativo de $\Delta\Psi_m$	87
6.3.3.1 Indicativo de $\Delta\Psi_m$ em <i>S. cerevisiae</i> submetida à HHP.....	87
6.3.3.2 Indicativo de $\Delta\Psi_m$ em <i>S. cerevisiae</i> com proteção mitocondrial submetida à HHP.....	92
6.3.4 DINÂMICA MITOCONDRIAL	96
6.3.4.1 Dinâmica mitocondrial em <i>S. cerevisiae</i> submetida à HHP.....	96
6.3.4.2 Dinâmica mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> com proteção mitocondrial submetida à HHP.....	98
6.3.5 PCR EM TEMPO REAL EM <i>S. CEREVISIAE</i> SUBMETIDA À HHP COM E SEM PROTEÇÃO MITOCONDRIAL.....	100

6.4 CONCLUSÕES	106
7 CONCLUSÃO FINAL DOS CAPÍTULOS 1 E 2	108
REFERÊNCIA	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO MODELO DE ESTUDO

Saccharomyces cerevisiae é um fungo, também chamado levedura, eucarionte, unicelular, muito utilizado como modelo para estudos relacionados ao envelhecimento, regulação de expressão gênica, transduções de sinais, ciclo celular, metabolismo, apoptose, desordens neurodegenerativas, dentre outros processos biológicos (KARATHIA et al., 2011). A característica de mais de 30% de genes ortólogos implicados em doenças humanas, fazem desta levedura um bom modelo para estudos genômicos (DUINA; MILLER; KEENEY, 2014; KARATHIA et al., 2011).

Este microrganismo pode se dividir por gemulação ou brotamento, processo em que uma pequena gêmula ou broto se forma e cresce até se separar da célula mãe (Fig. 1). Esta separação da célula filha deixa na célula mãe uma cicatriz de brotamento, pela qual é possível determinar a idade replicativa da célula. O número de cicatrizes na parede celular permite determinar a idade replicativa da célula. A forma de divisão assimétrica dessas células faz com que a célula-mãe retenha praticamente o dobro do volume de suas filhas. (FERNANDES *et al.*, 2009; KREGGER-VAN, 1987). As células mães são consideradas maduras, pois por definição, alcançaram o estágio final de diferenciação, o qual inclui a capacidade funcional de reproduzir e gerar descendentes, enquanto as células recém-nascidas são ainda imaturas por ainda não terem atingido o estágio que as tornem capazes de gerar descendentes (MALINA et.al, 2004).

S. cerevisiae possui parede celular bem definida com uma camada externa composta de manoproteínas e uma camada interna, de carboidrato. A camada de manoproteínas é porosa e protege a célula contra agentes externos, enquanto a camada de carboidrato é estrutural e confere proteção contra choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos (FLEURI; SATO, 2005).

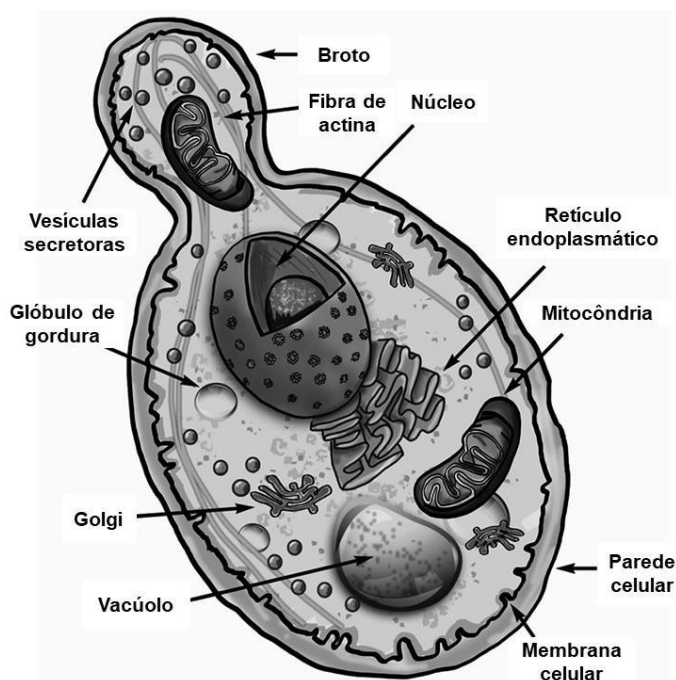


Figura 1: Principais características típicas de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae*. O conteúdo organelar é comum entre os demais eucariontes. Apresenta parede celular e neste esquema, se divide por brotamento, originando uma célula filha que recebem parte do seu conteúdo de organelas. Fonte: Beverages, 2016 (adaptado).

Dentre as vantagens da utilização desse microrganismo em estudos científicos estão o baixo risco de patogenicidade, curto ciclo de vida, que permite amplos estudos sobre envelhecimento em tempos mais curtos, e o fato do seu genoma está totalmente sequenciado desde 1996 (ALTMANN; DÜRR; WESTERMANN, 2007). As pesquisas com leveduras estabeleceram seu lugar na história iniciando com as primeiras demonstrações de atividades enzimáticas fora de uma célula feitas por Edward Buchner no início do século XX, o qual lançou as bases para as análises bioquímicas de metabólitos (DUINA; MILLER; KEENEY, 2014).

Outra característica de *S. cerevisiae* é ser um organismo anaeróbio facultativo, capaz de realizar tanto o metabolismo respiratório, quanto fermentativo. O metabolismo fermentativo predomina sobre o respiratório em meio com concentrações elevadas de açúcares, mesmo sob condições aeróbicas. Este comportamento metabólico ocorre, pois a alta concentração de glicose inibe a expressão de genes envolvidos com a via respiratória (FERNANDES et al., 2009; TREVISOL et al., 2011). No entanto, esta levedura é capaz de suprir suas necessidades energéticas

consumindo o ATP gerado pela fermentação alcoólica (FERNANDES, P.M.B.; FARINA; KURTENBACH, 2001). Porém, o silenciamento ou deleção de genes específicos permite a geração de mutantes viáveis para a realização de estudos mitocondriais, bem como de mecanismos de resposta ao estresse (ALTMANN; DÜRR; WESTERMANN, 2007; FERNANDES, P. M.B.; FARINA; KURTENBACH, 2001).

1.2O ESTRESSE OXIDATIVO E A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Todo organismo possui uma condição ótima para um crescimento constante sob uma atividade metabólica ideal. Assim, o estresse pode ser entendido como o desvio desta condição normal, o qual irá induzir uma resposta ao dano causado (HOHMANN; MAGER, 2003). Os principais estresses físicos aos quais os microrganismos como a *S. cerevisiae* estão susceptíveis são variação de temperatura, pressão, variações de pH, estresse osmótico e hipóxia (HOHMANN; MAGER, 2003). A resposta ao estresse neste microrganismo é extremamente importante, pois mudanças abruptas no ambiente podem interferir no correto funcionamento das atividades celulares. Deste modo, um rápido ajuste no metabolismo e no padrão de expressão gênica se faz necessário para que a célula se adapte a nova situação (ESTRUCH, 2000; GASH, 2003; ROKHLENKO et al., 2006).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção através de sistemas biológicos capazes de eliminar ou reparar os danos por eles provocados. Os organismos aeróbicos são expostos constantemente a espécies reativas do oxigênio (ROS), grande parte decorrente do metabolismo normal (DEMASI et al., 2006; HERRERO et al. 2007). No entanto, em níveis levemente elevados, ROS pode ser benéfico, pois ativa vias de sinalização para a produção de moléculas protetoras contra o estresse (ZADRAG-TECZA et al., 2018). Em níveis muito elevados, o acúmulo de ROS está associado a danos oxidativos a moléculas e estruturas celulares importantes para o bom funcionamento celular (HOHMANN; MAGER, 2003).

A respiração mitocondrial é a principal geradora de espécies reativas em eucariontes. Para gerar ATP, os elétrons são transportados ativamente ao longo da cadeia transportadora de elétrons através de um complexo de proteínas carreadoras.

Ao fim deste processo chamado fosforilação oxidativa, o oxigênio molecular atua como um acceptor final de elétrons, formando água (MURPHY, 2009). O oxigênio molecular é pouco reativo, mas ao ser reduzido forma ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, que ao reagirem produzem hidroxil, um radical altamente reativo. Deste modo, a toxicidade de ROS pode resultar em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao genoma (DEMASI et al., 2006; HERRERO et al. 2007).

A resposta de defesa a níveis elevados de ROS tem sido considerado de extrema importância para a manutenção do estado redox e prevenção da morte celular. Um importante mecanismo de defesa é a modulação do padrão de expressão gênica para indução de genes de resposta ao estresse oxidativo e síntese de enzimas antioxidantes (KUGE et al., 1997).

1.3 A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (HHP)

A pressão pode ser definida como uma força aplicada em uma unidade de área sob uma dada superfície (RIVALAIN et al., 2010). A alta pressão hidrostática (HHP) é um equipamento composto por uma cápsula de aço ou vaso de alta pressão, fechado por uma rosca em sua parte inferior. O meio a ser pressurizado é inserido em um tubo de teflon e hermeticamente fechado por um pistão de aço sem a presença de bolhas de ar. A cápsula é então inserida sobre um suporte de pressão na prensa hidráulica. A pressão é então aplicada através de bombeamento mecânico calibrado manualmente (Fig. 2). Na HHP, um valor de pressão aplicado pode ser mantido o mesmo em todas as direções do espaço por um determinado período (RIVALAIN et al., 2010). Sabe-se que pequenas variações dos valores de HHP podem provocar profundas mudanças em sistemas moleculares, sendo a HHP portanto, considerada um estresse (FERNANDES, 2005).

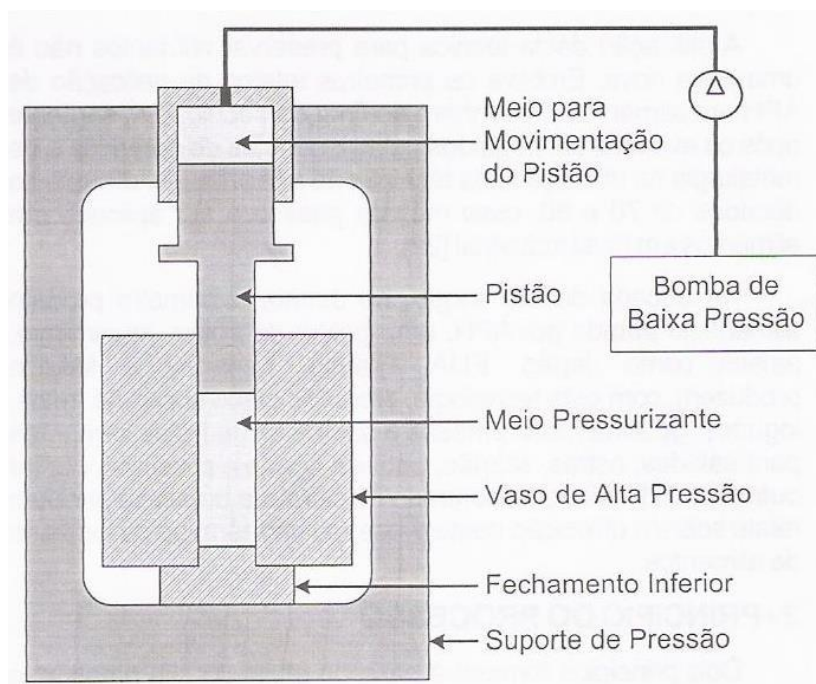


Figura 2: Representação de um equipamento de alta pressão hidrostática (HHP). O equipamento é composto por uma cápsula de aço ou vaso de alta pressão, fechado por uma rosca em sua parte inferior. O meio a ser pressurizado é inserido em um tubo de teflon e hermeticamente fechado por um pistão de aço sem a presença de bolhas de ar. A cápsula é então inserida sobre um suporte de pressão na prensa hidráulica. A pressão é então aplicada através de bombeamento mecânico calibrado manualmente.

A HHP é uma ferramenta biotecnológica muito utilizada em indústrias alimentícias para a descontaminação de alimentos, mas também pode ser um importante modulador de atividades enzimáticas, desagregação de proteínas, preparação de vacinas, dentre outros (AERTSEN et al., 2005). A HHP pode gerar efeitos capazes de levar à formação de produtos com novas propriedades funcionais. Deste modo, a potencialidade dessa técnica tem sido empregada em diferentes campos de estudo (SCHUWARTZ et al., 2011).

A HHP induz estresse oxidativo em leveduras, podendo provocar compactação do volume celular, redução da fluidez das membranas, polimerização e desnaturação de proteínas, interrupção o processo de divisão celular para induzir vias de sinalizações envolvidas na resposta ao estresse, dentre outros (BRAVIM, F et al., 2010; FERNANDES, P. M.B.; FARINA; KURTENBACH, 2001; FERNANDES, P.M.B., 2005). Estudos demonstram que a pressão de 50 megapascal (MPa) aplicada em *S. cerevisiae* é capaz de tornar o processo fermentativo da glicose em etanol mais rápido

e com maior rendimento que o processo natural à pressão ambiente (BRAVIM et al., 2013). O piezotratamento de 50 MPa é considerado um estresse brando, não letal para as leveduras, capaz de induzir resistência às células submetidas a um posterior estresse severo à partir de 100 MPa (FERNANDES, P.M.B., 2005; PALHANO et al., 2004). Entretanto, esta resistência só é alcançada após permitir às células um período de 15 min de recuperação em pressão ambiente, antes de aplicar o tratamento severo de HHP (PALHANO et al., 2004).

Uma análise de micro-arranjo que avaliou o padrão de expressão genômica de *S. cerevisiae* em resposta a HHP mostrou que o estresse severo de HHP induz o aumento da regulação de genes envolvidos com metabolismo de carboidratos, resposta celular ao estresse, respiração aeróbica e inibe a regulação de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e de síntese de proteínas (FERNANDES, P.M.B et al., 2004). Em contrapartida, um outro estudo demonstrou que um estresse subletal de HHP induz o aumento na expressão de genes relacionado com a síntese de lipídeos e metabolismo de aminoácidos (IWAHASHI et al., 2005)

Por induzir estresse oxidativo com melhor resposta adaptativa que o estresse oxidativo convencional com o uso de H₂O₂, essa ferramenta foi escolhida para analisar a influência das mitocôndrias sobre a regulação de genes relacionados com envelhecimento em resposta ao estresse de HHP.

1.4 A MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é uma organela de grande importância para os eucariontes. Elas desempenham um papel primordial no metabolismo energético, funcionando como uma maquinaria em síntese e aproveitamento de ATP (adenosina trifosfato), favorecendo o equilíbrio elétrico, quimio-osmótico e de transformações energéticas da célula (ALBERT et al., 2002). Além disso, a mitocôndria é a principal sinalizadora para a morte celular programada ou apoptose (GOODSELL, 2010). A principal tarefa da mitocôndria é sintetizar ATP à partir da energia liberada pela oxidação de glicídios, lipídios e proteínas, os quais ofertam substratos para a cadeia respiratória através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou ciclo de Krebs (SOUSA; IMPRIMA; VONCK, 2018).

A glicólise que ocorre no citosol fornece duas moléculas de piruvato. O piruvato atravessa a membrana mitocondrial e na presença do oxigênio é oxidado à acetil-CoA. Na matriz mitocondrial o acetil-CoA inicia o ciclo de Krebs. A partir deste momento ocorre uma série de reações químicas que liberam elétrons com altos níveis de energia. Essa energia é então armazenada nas formas de GTP, NADH e FADH₂ que serão utilizadas na fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2013).

A fosforilação oxidativa é o processo de transferência de elétrons de NADH ou FADH₂ para o O₂ através de uma série de elétrons carreadores com a finalidade de formar ATP (Fig. 3). Este processo é possível graças a um complexo de proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna (MMI) que produzem o bombeamento de prótons de um lado para o outro da membrana mitocondrial (MORELLI et al., 2019). Os elétrons provenientes da matriz mitocondrial presentes na MMI são bombeados através dos complexos I, III e IV para o interior do espaço intermembranas (Fig. 3). O aumento da concentração de H⁺ neste espaço intermembranas promove o retorno desses prótons ao interior da mitocôndria por difusão através das sintetases de ATP, promovendo a fosforilação (Pi) de ADP em ATP (MURRAY et al., 2013). Assim, a fosforilação oxidativa acarreta um rendimento de 26 dentre as 30 moléculas de ATP formadas pela completa oxidação da glicose em CO₂ e H₂O (ALBERT et al., 2002).

O complexo de proteínas I, II, III e IV da MMI são responsáveis pela regulação da respiração (Fig.3). Os complexos I (NADH desidrogenase), III (citocromo bc₁) e IV (citocromo c oxidase) realizam o bombeamento de prótons que geram o potencial elétrico e liberam energia que será aproveitada para a síntese do ATP. O complexo II (succinato desidrogenase) não bombeia prótons, mas faz parte do ciclo de Krebs por catalizar a oxidação do succinato em fumarato e reduzir a ubiquinona em ubiquinol, que é um substrato para o complexo III. Assim, o complexo II atua como um segundo ligante direto do ciclo TCA à cadeia respiratória, além do NADH que entra na cadeia pelo complexo I (SOUSA; IMPRIMA; VONCK, 2018). Os complexos I e III são as principais fontes de ROS da cadeia respiratória (TORRE-RUIZ et al., 2012). Assim, a inibição dos complexos I, III e IV inibe a respiração e o aumento do potencial da membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (ARNOLD, 2012).

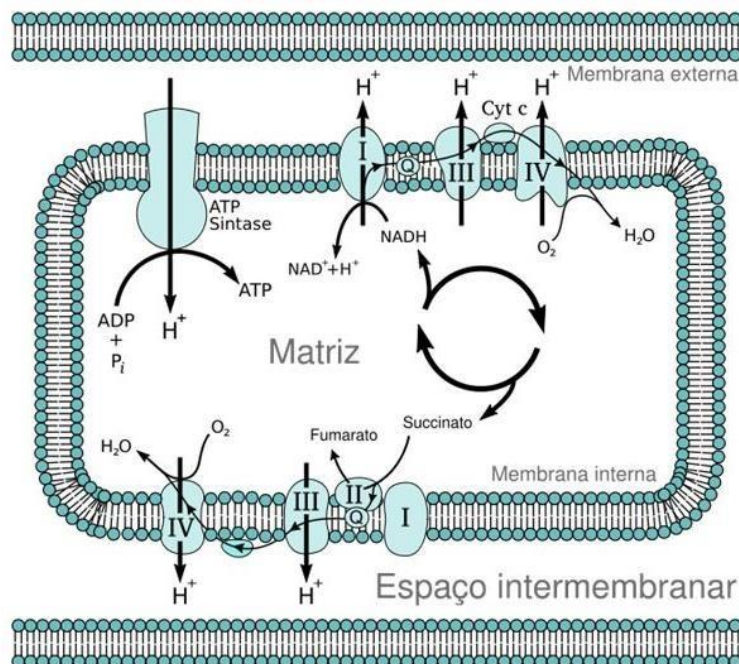


Figura 3: Representação da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na mitocôndria. A CTE é o local onde ocorre a fosforilação oxidativa em eucariontes. A CTE recebe elétrons de NADH e os transfere para o O_2 que atua como receptor final de elétrons, utilizando a energia liberada para gerar um gradiente de prótons na membrana. O ATP sintase utiliza o gradiente de prótons para sintetizar ATP. Deste modo, o NADH e o succinato produzidos no ciclo dos ácidos carboxílicos são oxidados, liberando energia a ser utilizada pela ATP sintase.

O bom funcionamento das mitocôndrias é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de eucariontes. Evidências suportam que o declínio progressivo da função mitocondrial relacionado a idade é uma característica observada no envelhecimento celular em eucariontes distantes (BEACH et al., 2015). A exposição aos estresse ambientais provocam, dentre outros, alterações morfológicas (PICARD et al., 2013) e da atividade da membrana mitocondrial. Anormalidades morfológicas de mitocôndrias tem sido observadas em pessoas com doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (RODRÍGUEZ et al., 2012). O mal funcionamento dessa organela tem sido associado a esquizofrenia (RAJASEKARAN et al., 2015) e suas disfunções metabólicas ao câncer (PORPORATO et al., 2018).

Considerando que as mitocôndrias passam por importantes alterações em respostas as mudanças ambientais, percebemos a importância de observar algumas destas alterações mediante o estresse de HHP, a fim de compreender melhor o

mecanismo de resposta ao estresse a nível mitocondrial e como isto pode se relacionar com o envelhecimento. Sendo assim, neste trabalho serão abordados de forma especial o comportamento morfológico, bem como as indicativas variações do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das mitocôndrias em células jovens e maduras de *S. cerevisiae* mediante a indução de estresse oxidativo por HHP. Também será abordado quais mudanças podem ocorrer quando estas mitocôndrias recebem uma prévia proteção contra este estresse.

1.5 DINÂMICA MITOCONDRIAL NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

A mitocôndria é considerada uma organela dinâmica devido a sua capacidade de se fissionar ou fundir continuamente mediante alterações ambientais ou por ocasião da divisão celular (STAB et al., 2016; ZEMIRLI; MOREL; MOLINO, 2018). O equilíbrio entre estes dois mecanismos é responsável pela forma, a distribuição da organela no citoplasma com características de redes entrelaçadas e por sua funcionalidade. No entanto, se este delicado balanço for afetado as suas funcionalidades também serão afetadas (STAB et al., 2016). Logo, alterações na dinâmica mitocondrial podem contribuir para disfunções mitocondriais associadas ao envelhecimento (SEO et al., 2010).

A dinâmica mitocondrial é importante para manter a qualidade mitocondrial através de modulação celular do estado redox, da integridade do mtDNA, da função organelar e morte celular (SEO et al., 2010). Entretanto, também pode ser desvantajosa e propiciar danos moleculares quando as mitocôndrias possuem um certo grau de dano. Estudos têm constatado que tanto em leveduras como em mamíferos o estado bioenergético das mitocôndrias está relacionado a sua morfologia (FIGGE; OSIEWACZ; REICHERT, 2013).

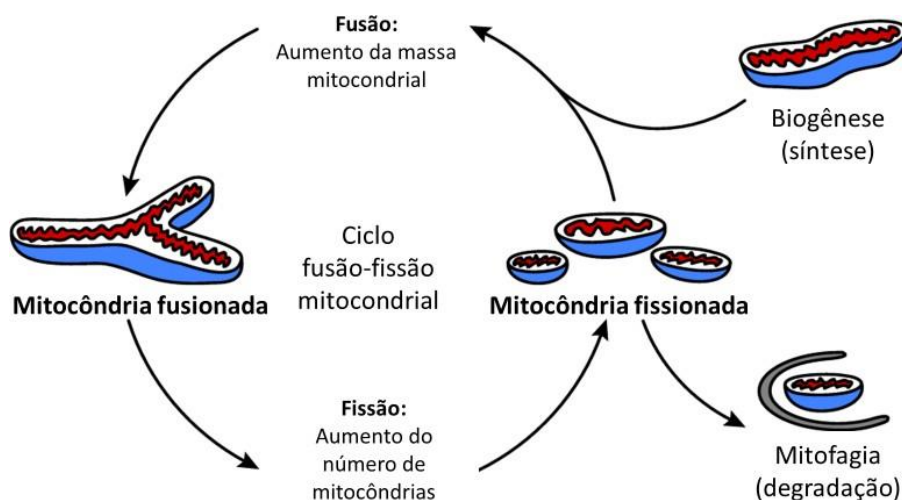


Figura 4: Esquema da dinâmica mitocondrial. Como demonstra a figura, a biogênese induz a fusão que aumenta a massa mitocondrial. A fissão reduz a massa mitocondrial e favorece a degradação de mitocôndrias disfuncionais pela maquinaria da mitofagia. Fonte: Journal of Cell Science, 2010 (adaptado).

Um teste computacional e matemático da hipótese teórica sobre a dinâmica do controle da qualidade mitocondrial mostrou que mitocôndrias de alta qualidade sofrem constantes processos de fusão-fissão e isto parece ter por finalidade a mitofagia e remoção das organelas danificadas. Diante disto, acredita-se que mitocôndrias com baixa funcionalidade ou inativas contribuem para a fragmentação, tornando-se isoladas da rede mitocondrial, aguardando a mitofagia (FIGGE; OSIEWACZ; REICHERT, 2013).

O processo de fusão aumenta a massa mitocondrial (Fig. 4), acredita-se também que favoreça uma proteção funcional às mitocôndrias, por permitir trocas de conteúdos que podem reduzir constituintes danificados e auxiliar no processo de reparo (STAB et al., 2016). Pois, quando há um melhor funcionamento das mitocôndrias nota-se uma ativação da maquinaria de fusão dessas organelas (FIGGE; OSIEWACZ; REICHERT, 2013). A fissão aumenta o número de mitocôndrias e isto permite que organelas disfuncionais fiquem isoladas e sejam degradadas por mitofagia. Assim, o constante processo de renovação das mitocôndrias é crucial para mantê-las saudáveis com a idade. (SEO et al., 2010).

Sabe-se que células jovens de adipócitos humanos possuem quantidades menores de mitocôndrias, de tamanhos menores e que formam uma rede levemente

interconectada. Já as células senescentes possuem mitocôndrias em maior número e tamanho, formando uma rede altamente interconectada e uniformemente distribuída pelo citoplasma (STAB et al., 2016). Assim, a quantidade e a qualidade das mitocôndrias devem ser bem supervisionadas pela célula durante a progressão do ciclo celular, para que células mães e filhas evitem acumular quantidades insuficientes ou excessivas de organelas (KNORRE et al., 2016).

1.6 O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E CONSEQUÊNCIAS DISFUNCIONAIS

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um processo gerado pelo bombeamento de prótons através dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória, e tem um importante papel na homeostase celular. É um componente essencial para a geração de energia durante a fosforilação oxidativa. Sob condições fisiológicas normais, o $\Delta\Psi_m$ e a produção de ATP se mantêm em níveis relativamente estáveis (ZOROVA et al., 2018). Em estado de repouso o $\Delta\Psi_m$ é mantido em torno de -180 mV. Pequenas flutuações do $\Delta\Psi_m$ podem ocorrer por reflexo da atividade fisiológica normal da célula com oscilações que geralmente variam entre os limiares de -150 a -220 mV (PERRY et al., 2011). No entanto, mudanças sustentadas deste potencial podem acarretar efeitos deletérios, perda da viabilidade e estão envolvidas com diversas patologias em eucariontes superiores (PERRY et al., 2011; ZOROVA et al., 2018).

Evidências mostram que tanto o aumento, quanto a redução do $\Delta\Psi_m$, também chamados respectivamente, hiperpolarização e despolarização, podem levar as células à morte por apoptose (ZHANG et al., 2010; ZOROVA et al., 2018). No primeiro caso, a despolarização provoca o aumento da permeabilidade da membrana, permitindo maior influxo de Ca^{2+} para o interior das mitocôndrias. No interior da membrana interna, o Ca^{2+} se liga à cardiolipina, provocando alterações de conformação dessas proteínas, liberando o citocromo C para o citosol. Ao sair para o citosol, o citocromo c ativa a cascata das capases, que são uma família de enzimas que acionam mecanismos que levam a célula à morte por apoptose (ZHANG et al., 2010), ver figura 8 em capítulo 2. Há também relatos que a despolarização abaixo de um determinado limite de $\Delta\Psi_m$ pode indicar comprometimento da função mitocondrial,

sendo um pré-requisito para a mitofagia. Eventos de fissão estão associados a prolongadas despolarizações e podem produzir mitocôndrias filhas “marcadas” pela maquinaria de mitofagia (TWIG; LAS; SHIRIHAI, 2013).

No caso do aumento do $\Delta\Psi_m$ ou hiperpolarização, ocorre uma elevação na geração de energia da membrana interna mitocondrial e aceleração da cadeia respiratória para a síntese de ATP. Porém, a cadeia respiratória é também a principal geradora de ROS intracelular (ZOROVA et al., 2018). Como se sabe, os radicais livres são responsáveis por danos a componentes celulares que, dentre outras injúrias, resultam em peroxidação lipídica de membranas. Acredita-se que a peroxidação lipídica pode causar alterações da conformação e de tensão da membrana mitocondrial, comprometendo o seu potencial (LEE et al., 2016; ZADRAĞ-TEĆZA et al., 2018)

Devido à alta reatividade das ROS, as mitocôndrias não apenas são as principais geradoras, como também são o alvo central dos danos oxidativos que geram. Por tais motivo, estas organelas são consideradas as principais determinantes do envelhecimento celular (GREDILLA; GRIEF; OSIEWACZ, 2006). Sendo assim, a manutenção do $\Delta\Psi_m$ o mais próximo possível do seu estado fisiológico (polarizado) é essencial para manter a saúde e a viabilidade celular (PERRY et al., 2011; ZOROVA et al., 2018).

1.7 O ÁCIDO PROTOCATECUICO: UM PROTETOR DE MITOCÔNDRIAS

O ácido protocatecuico (PCA) é um composto fenólico, encontrado em algumas plantas como a *Camellia sinensis*, conhecida como “chá-verde”, *Hibiscus sabdariffa* e em outros alimentos como ameixas, uvas, nozes, amêndoas, cebola, arroz integral e azeitonas. Pesquisas sobre as propriedades biológicas e farmacológicas do PCA, demonstram que esse composto possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e sequestradora de radicais livres (SON et al., 2018).

O PCA possui similaridade estrutural com outros compostos antioxidantes como os ácidos gálico, cafeico e valínico. Suas propriedades também possuem efeitos analgésicos, anti-bacterianos e anti-envelhecimento, além de ajudar a evitar peroxidação lipídica tecidual e inibir efeitos de estresse oxidativo exaustivo (MUTHUKUMARAN et al., 2013). A molécula de PCA possui uma estrutura química

que expõe três radicais hidroxilas (Fig. 5). Essa conformação favorece que o PCA atue como um doador de elétrons (doando íons hidrogênio), para a neutralização de ROS, evitando que estes radicais livres causem danos a estruturas celulares importantes. O PCA também atua como um protetor de mitocôndrias através da sua capacidade de impedir o aumento do $\Delta\Psi_m$ e evitar apoptose por disfunções mitocondriais, além de proteger contra danos oxidativos (LIU et al., 2008).

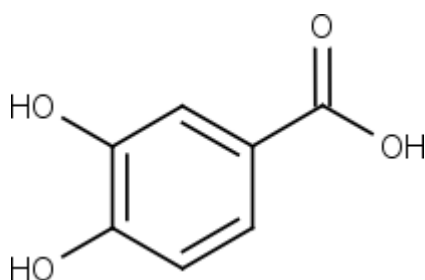


Figura 5: Esquema da estrutura molecular do ácido protocatecuico (PCA). Observa-se que esta molécula expõe três radicais OH. Estes radicais atuam como doadores de íons H^+ para outras moléculas altamente reativas (radicais livres) que necessitam receber elétrons para se estabilizarem. A neutralização destes radicais livres pela doação de elétrons do PCA evita que os radicais livres reajam com moléculas que compõem estruturas importantes para o bom funcionamento celular.

Estudos reportam que o PCA é capaz de inibir a metástase de células tumorais por inibir a regulação das vias metabólicas ativadoras de mitose, provocando a parada do ciclo celular e interrompendo a apoptose por via mitocondrial (LIN, H. H. et al., 2011). Porém, os benefícios do PCA estão vinculados à concentração utilizada. Quantidades excessivas levam à toxicidade, reduzindo a viabilidade celular por interromper o $\Delta\Psi_m$, levando também à morte por apoptose (PEREIRA et al., 2017).

1.8 GENES ENVOLVIDOS COM ENVELHECIMENTO, LONGEVIDADE E RESPOSTA AO ESTRESSE

Alguns genes são bem conhecidos na literatura como envolvidos com envelhecimento, longevidade e defesas antioxidantes. Dentre estes, foram escolhidos

para este estudo: TOR1, RAS2, SCH9, SGS1, SIR2, CTT1 e SOD2. Segue abaixo a tabela 1, com uma breve descrição de cada gene.

Genes	Nome	Descrição
TOR1	<i>Alvo da rapamicina</i>	<i>Subunidade TORC1 controla crescimento em resposta a nutrientes e estresse celular; envolvido com envelhecimento cronológico, hipóxia e apoptose.</i>
RAS2	<i>Proteína ligante de GTP</i>	<i>Regula crescimento e transcrição em resposta a alterações de nutrientes; homólogo de Ras proto-oncogene de mamíferos; envolvido no metabolismo respiratório e produção de cAMP pela adenilato ciclase.</i>
SCH9	<i>Proteína quinase da família ACG</i>	<i>Ortólogo a S6 quinase de mamíferos; fosforilado por Tor1p; envolvido na transativação de genes de resposta ao estresse osmótico; regula a progressão G1; integra sinais de nutrientes; envolvido na síntese ubiquitinas e esfingolipídeos; regulação do tempo de vida.</i>
SGS1	<i>Supressor de crescimento lento</i>	<i>Família DNA nucleolar ReQ-helicase; envolvido na manutenção da integridade genômica e longevidade.</i>
SIR2	<i>Regulador de informações de silenciamento</i>	<i>Histona desacetilase dependente de NAD + da família Sirtuin; requerido no reparo de telômeros e silenciamento de rDNA; envolvido na regulação do tempo de vida.</i>
CTT1	<i>Catalase T1</i>	<i>Catalase citosólica T; papel na proteção de danos oxidativos por H₂O₂.</i>
SOD2	<i>Superóxido dismutase 2</i>	<i>Superóxido dismutase-manganês mitocondrial; proteção contra toxicidade de oxigênio reativo e estresse oxidativo.</i>

Table 1: Genes analisados e descrição de suas funcionalidades (SGD, <http://www.yeastgenome.org>)

A via TOR1, alvo da rapamicina (TOR1, do inglês *target of rapamycin*) é conhecida por seu envolvimento com o envelhecimento cronológico (SWINNEN et al., 2014), já que a inibição de mTOR tem mostrado estender o tempo de vida de vários organismos, embora os exatos mecanismos desta regulação ainda não esteja totalmente esclarecidos (FINKEL, 2015). mTOR1 é sensível a vários fatores como

hipóxia, danos ao DNA, estresse osmótico e oxidativo, devido sua influência na biossíntese de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos em resposta aos sinais de indução de crescimento (ORTELLS et al., 2012). A ativação de TORC1 tem sido associada com o processo de envelhecimento natural e precoce, e também com a indução de apoptose (ALMEIDA et al., 2009). Em contraste, a inibição genética na sinalização de mTOR pode estender o tempo de vida de diversos organismos modelo (FINKEL, 2015).

RAS2 codifica proteínas ligantes de GTP. Está envolvido na produção de GTPases/proteína G, que são marcadores de superfície celular com importante papel no controle do metabolismo, proliferação, diferenciação, apoptose e senescência. A hiperativação da via RAS2 é altamente oncogênica em genes ortólogos de eucariontes superiores, induz formação de pseudo-hifas em leveduras e desordens de proliferação celular. Por outro lado, a deleção deste gene tem mostrado estender o tempo de vida cronológico em leveduras (BROGGI; MARTEGANI; COLOMBO, 2013; SLACK et al., 2015). Em leveduras, RAS2 produz GTPases que atuam como alvos para a ativação de PKA dependente de cAMP, os quais catalisam a fosforilação de proteínas. A fosforilação provoca estímulos intra e extracelulares que, dentre outros, controlam a atividade de proteínas mitocondriais (BROACH, 1991; PETKOVA et al., 2010). Além disso, é reconhecido pela comunidade científica que o complexo TOR1 é sensível às variações de regulação da via RAS2 (PETKOVA et al., 2010).

SCH9, precursor de Sch9 AGC-quinase é bastante citado na literatura por seu envolvimento com o envelhecimento (QIE et al., 2015; URBAN et al., 2007). Sch9 AGC quinase é um substrato de TORC1 em *S. cerevisiae*. A fosforilação dos resíduos de Sch9 AGC quinase, dependente de TORC1 é transitoriamente reduzida após estresses osmótico, oxidativo e térmico (URBAN et al., 2007). *SCH9* também controla a resposta ao estresse por regular a ubiquitinação de proteínas intracelulares, que trata da identificação de proteínas com defeitos de conformação para serem degradadas pelos proteossomos. A maior regulação de SCH9 aumenta a respiração mitocondrial durante o crescimento, promovendo a geração de superóxidos em leveduras. Em contraste, a sua deleção reduz os níveis de proteínas ubitiquinadas na fase log de crescimento, mostrando ter um importante papel no controle da longevidade (QIE et al., 2015).

O gene supressor de crescimento lento 1, SGS1 pertence à família RecQ-helicases de DNA nucleolar. Este gene é de grande importância na manutenção da

integridade genômica por prevenir e reparar danos ao DNA em leveduras e humanos (BERNSTEIN; GANGLOFF; ROTHSTEIN, 2010; SYED; SCHMIDT, 2018). A deleção de SGS1 em *S. cerevisiae* promove fenótipos de envelhecimento precoce, devido à instabilidade genômica. Geralmente, a regulação deste gene aumenta durante a vida, mas é reduzida quando se inicia a senescência (quando o organismo perde a capacidade de se reproduzir). Por esta razão, este gene é considerado de grande importância para a promoção da longevidade (BERNSTEIN; GANGLOFF; ROTHSTEIN, 2010). Estudos mostram que o aumento da regulação de SGS1 aumenta significativamente o tempo de vida em leveduras, por inibir o acúmulo de rDNA (DNA ribossomal) extra cromossômico (OSIEWACZ; BERNHARDT, 2013).

O regulador de informações de silenciamento 2 (SIR2) é um codificador de proteínas sirtuínas que promovem a desacetilação de proteínas histonas na presença de NAD⁺, regulando o silenciamento genômico dos telômeros, reduzindo os poderosos efeitos maléficos do acúmulo de rDNA extra cromossômico associado ao envelhecimento (LIN, S. J.; DEFOSSEZ; GUARENTE, 2000; LU; LIN, 2010). O requerimento de NAD⁺ acarreta para SIR2 potencial propensão de ser regulado por flutuações nos níveis dessa molécula ou intermediários do metabolismo celular. SIR2 é considerado um fator pró-longevidade em *S. cerevisiae*, já que sua deleção reduz e sua maior regulação estende o tempo de vida replicativo. Este gene também tem sido implicado como um mediador dos efeitos benéficos da restrição calórica em leveduras e eucariontes superiores (WIERMAN; SMITH, 2014).

As superóxido-dismutases (SODs) e as catalases (CTTs) são algumas das enzimas com ações antioxidantes que atuam na redução de danos oxidativos nas células (FERNANDES, Patricia M B et al., 2004; RATTANAWONG; KERDSOMBOON; AUESUKAREE, 2015). SOD2 é encontrado na matriz mitocondrial. As SODs atuam convertendo ânions superóxidos (O₂⁻) altamente reativos em peróxido de hidrogênio H₂O₂ (moléculas menos reativas). CTT1 é descrita como catalase citosólica e age convertendo as moléculas de H₂O₂ em H₂O + O₂. Assim, esta enzima impede que estas moléculas nocivas prejudiquem outras moléculas essenciais ao bom funcionamento da célula (RATTANAWONG; KERDSOMBOON; AUESUKAREE, 2015).

2 HIPÓTESE

A mitocôndria é considerada uma organela-chave para estudos sobre o envelhecimento. Disfuncionalidades desta organela têm sido associadas com o surgimento de inúmeras doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Sabe-se que genes envolvidos com o envelhecimento como TOR1, RAS2 e SCH9 regulam o funcionamento das mitocôndrias, no entanto, é possível que a mitocôndria também influencie a regulação destes genes.

3 JUSTIFICATIVA

Esta pesquisa justifica-se pelo crescente interesse da comunidade científica em compreender o processo de envelhecimento a nível celular e molecular. O uso de uma ferramenta biotecnológica como a HHP em organismo modelo como a *S. cerevisiae* é uma aplicação útil que viabiliza importantes estudos que envolvem mecanismos de resposta ao estresse, genômica e envelhecimento. Deste modo, esta pesquisa pode contribuir com avanços científicos na área do envelhecimento, para a produção de produtos e processos biotecnológicos que possam retardar o envelhecimento e os efeitos deletérios deste processo, além da produção de cepas de leveduras mais resistentes para a fabricação de produtos que utilizam microrganismos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Mostrar que as mitocôndrias influenciam a regulação de genes envolvidos com envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estresse severo de alta pressão hidrostática.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar células mães e filhas de *S. cerevisiae*;
- Pré-tratar células com HHP subletal e ácido protocatecuico;
- Submeter as células ao estresse severo de HHP;
- Analisar acúmulo de ROS e $\Delta\Psi_m$;
- Analisar dinâmica mitocondrial;
- Marcar superfície celular de células mães;
- Separar células mães e filhas;
- Analisar regulação de genes envolvidos com envelhecimento e defesas antioxidantes;
- Comparar respostas ao estresse severo de HHP de células pré-tratadas com HHP subletal e células pré-tratadas com ácido protocatecuico;

REFERÊNCIA

ALBERTS, B.; HOHNSON, A.; LEWIS L. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4.ed. The Mitochondrion. New York: Garland Science. 2002.

AERTSEN, A. et al. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2226–2231, 2005.

ALMEIDA, B. et al. Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 720–732, 2009.

ALTMANN, K.; DÜRR, M.; WESTERMANN, B. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 372, n. 1, p. 81–90, 2007.

ARNOLD, S. The power of life-Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 46–56, 2012.

BEACH, A. et al. Mechanisms by which different functional states of mitochondria define yeast longevity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5528–5554, 2015.

BERNSTEIN, K. .; GANGLOFF, S.; ROTHSTEIN, R. The RecQ DNA helicases in DNA Repair. **Annual review of genetics Rev Genet**, v. 44, p. 393–417, 2010.

BONAWITZ, N. D. et al. Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 265–277, 2007.

BOQUETT, J. A.; FERREIRA, R. J. Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras Biological aspects and tumorigenic activity of the Ras proto-oncogenic family. **Semina : Ciências Biológicas e da Saúde**, n. 2, p. 201–211, 2010.

BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure and the cell membrane: stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1189, p. 127–132, 2010.

BRAVIM, F. et al. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1071–1079, 2010.

BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093–2107, 2013.

BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure leads to free radicals accumulation in yeast cells triggering oxidative stress. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. 1–9, 2016.

BROACH, J. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. **Trends in Genetics**, v. 7, n. 1, p. 28–33, 1991.

BROGGI, S.; MARTEGANI, E.; COLOMBO, S. Nuclear Ras2-GTP controls invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79274, 2013.

CAO, L. L. et al. Control of mitochondrial function and cell growth by the atypical cadherin Fat1. **Nature**, v. 539, n. 7630, p. 575–578, 2017.

CAPELSON, M.; HETZER, M. W. Development and Disease. **Molecular Biology**, v. 15, n. June, p. 1–9, 2009.

CHEN, F. et al. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 1483–1495, 2017.

DEMASI, A. P. D.; PERREIRA, G. A. G.; NETTO, L. E. S. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. **FEBS Journal**, v. 273, p. 805-816, 2006.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 2014.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469-486, 2000.

FERNANDES, P. M.B.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42–46, 2001.

FERNANDES, P.M.B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 38, n. 8, p. 1239–1245, 2005.

FERNANDES, P. M. B. et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS letters**, v. 556, n. 1–3, p. 153–160, 2004.

FERNANDES, P. M. B et al. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FIALKOVA, V. et al. DNA methylation as mechanism of apoptotic resistance development in endometrial cancer patients. **General Physiology and Biophysics**, v. 36, n. 5, p. 521–529, 2017.

FIGGE, M. T.; OSIEWACZ, H. D.; REICHERT, A. S. Quality control of mitochondria during aging: Is there a good and a bad side of mitochondrial dynamics? **Bio Essays**, v. 35, n. 4, p. 314–322, 2013.

FINKEL, T. The metabolic regulation of aging. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1416–1423, 2015.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871–879, 2005.

GASH, A. P. **The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses**. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). *Yeast*

stress response. 2. nd. Alemanha: Springer, p. 11-57, 2003

GOODSELL, D. S. Miniseries : Illustrating the Machinery of Life Mitochondrion *. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, n. 3, p. 134–140, 2010.

GRANT, C. M.; PERRONE, G.; DAWES, I. W. Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, v. 253, n. 3, p. 893–898, 1998.

GREDILLA, R.; GRIEF, J.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 4, p. 439–447, 2006.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *BBA*, v. 1780, p. 1217-1235, 2007.

HO, J.; BRETSCHER, A. Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 6, p. 1541–1555, 2001.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Introduction**. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). *Yeast stress response*. 2. nd. Alemanha: Springer, 2003.

HÖHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biology**, v. 11, n. 2017, p. 482–501, 2017.

IWAHASHI, H. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2847–2852, 2005.

KARATHIA, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism : A Comparative Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2011.

KNORRE, D. A. et al. How do yeast sense mitochondrial dysfunction? **Microbial Cell**, v. 3, n. 11, p. 532–539, 2016.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **Classification of yeast**. In: ROSE A. H., HARRISON, J. S. (Ed.). *The yeasts*. 2. ed. London: Academic Press, p. 5-61, 1987.

KUGE, O.; SAITO, K.; NISHIJIMA, M. Cloning of a Chinese hamster ovary (CHO) the phosphatidylserine synthase (PSS) II, overexpression of which supresses the phosphatidylserine biosynthetic defect of a PSS I-lacking mutant of CHO-K1 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 19133-19139, 1997.

LEE, C. P. et al. MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. **Plant Journal**, v. 88, n. 5, p. 809–825, 2016.

LIN, H. H. et al. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-κB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 237–254, 2011.

LIN, S. J.; DEFOSSEZ, P. a; GUARENTE, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-

span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5487, p. 2126–2128, 2000.

LIPPUNER, A. D.; JULOU, T.; BARRAL, Y. Budding Yeast as a Model Organism to Study the Effects of Age. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 2, p. 300–25, 2014.

LIU, Y. M. et al. Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 430–437, 2008.

LU, S. P.; LIN, S. J. Regulation of yeast sirtuins by NAD⁺ metabolism and calorie restriction. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 8, p. 1567–1575, 2010.

MALINA, R.M.; BOUCHARD, C.; BAR-OR, O. **Growth, Maturation, and Physical Activity**. 2. ed. United states: Human kinetics. 2004.

MORELLI, A. M. et al. An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. **Open Biology**, v. 9, n. 4, 2019.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v.417, p.1–13, 2009.

MURRAY, R. K. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 29. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

MUTHUKUMARAN, J. et al. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 4, p. 304–309, 2013.

NAMRATA, C. et al. A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. July, p. 1–15, 2014.

ORTELLS, M. C. et al. Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4368–4384, 2012.

OSIEWACZ, H. D.; BERNHARDT, D. Mitochondrial quality control: impact on aging and life span. **Gerontology**, v. 59, p. 413–420, 2013.

OULD AMER, Y.; HEBERT-CHATELAIN, E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1859, n. 9, p. 868–877, 2018.

PALHANO, F. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 447–457, 2004.

PEREIRA, D. M. et al. Toxicity of phenolipids: Protocatechuic acid alkyl esters trigger disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation in macrophages. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 206, p. 16–27, 2017.

PERELMAN, A. et al. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 11, p. 1–7, 2012.

PERRY, S. W. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient:

- a practical usage guide Seth. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98–115, 2011.
- PETKOVA, M. I. et al. Mtl1 is required to activate general stress response through TOR1 and RAS2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19521–19531, 2010.
- PICARD, M. et al. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 6, p. R393–R406, 2013.
- PORPORATO, P. E. et al. Mitochondrial metabolism and cancer. **Cell Research**, v. 28, n. 3, p. 265–280, 2018.
- PYATRIKAS, D. V. et al. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 12, 2015.
- QIE, B. et al. Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. **Redox Biology**, v. 5, p. 290–300, 2015.
- RAJASEKARAN, A. et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 48, p. 10–21, 2015.
- RATTANAWONG, K.; KERDSOMBOON, K.; AUESUKAREE, C. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione are involved in response to oxidative stress induced by protein denaturing effect of alachlor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 963–971, 2015.
- REN, M. et al. Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 3, p. 1367–1382, 2011.
- RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. **Biotechnology Advances**, p. 659–672, 2010.
- RODRÍGUEZ, G. E. et al. Morphological abnormalities in mitochondria of the skin of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 1, p. 45–51, 2012.
- ROKHLENKO, O., WEXLER, Y., YAKHINI, Z. Similarities and differences of gene expression in yeast stress conditions. **Bioinformatics**, v. 23, p. 184-190, 2006.
- SCHUWARTZ, C. et al. Aplicações da alta pressão hidrostática nas Ciências da Saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, p. 62-72, 2011.
- SEO, A. Y. et al. New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 15, p. 2533–2542, 2010.
- SLACK, C. et al. The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. **Cell**, v. 162, n. 1, p. 72–83, 2015.

SON, J. H. et al. Protective effect of protocatechuic acid against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. **Biomedical Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2018.

SOUSA, J. S.; IMPRIMA, E. D.; VONCK, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. In: HARRIS, J.; BOEKEMA, E. **Membr. Protein Complexes Struct. Funct.** Singapore: Springer, p. 167–227, 2018.

STAB, B. R. et al. Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. DEC, p. 1–10, 2016.

SUN, N.; YOULE, R. J.; FINKEL, T. The Mitochondrial Basis of Aging. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 654–666, 2016.

SWINNEN, E. et al. Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 17–32, 2014.

SYED, S.; SCHMIDT, K. H. Sgs1 Binding to Rad51 Stimulates Homology-Directed. v. 208, n. January, p. 125–138, 2018.

TORRE-RUIZ, M. A. et al. Signalling Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: LUSHCHAK, V. **Oxidative Stress - Mol. Mech. Biol. Eff.** Spain: In Tech, p. 255–277, 2012.

TREVISOL, E. T. V. et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 697–704, 2011.

TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433–446, 2008.

TWIG, G.; LAS, G.; SHIRIHAI, O. S. Autophagy in the Homeostasis of Pancreatic β -Cells. **Autophagy Heal. Dis.** Elsevier, p. 89–100, 2013.

URBAN, J. et al. Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 26, n. 5, p. 663–674, 2007.

WALKER, G.M.; STEWART, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, V. 2, n. 30, p. 1-12, 2016.

WIERMAN, M. B.; SMITH, J. S. Yeast sirtuins and the regulation of aging. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 73–88, 2014.

ZADRAŁ-GĘCZA, R. et al. Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects. In: SKONECZNY, M. **Stress Response Mech. Fungi**. 1. ed. Poland: Springer International Publishing, p. 1–34, 2018.

ZEMIRLI, N.; MOREL, E.; MOLINO, D. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–19, 2018.

ZHANG, G. X. et al. Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat. **Am J**

Physiol Heart Circ Physiol, v. 298, n. 2, p. H433-9, 2010.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 1 jul. 2018.

Este trabalho será apresentado em formato de artigo científico em dois capítulos. Deste modo, os itens: Material e métodos, Conclusões e Referência serão apresentados nos capítulos 1 e 2, de acordo com a metodologia e referências utilizadas em cada capítulo.

5 CAPÍTULO 1

Este capítulo se refere ao artigo aceito para publicação na revista “Fungal Biology”, conceito B1 (CAPES), resultante de parte da pesquisa desta tese de doutorado.

Classificação Qualis CAPES área biotecnologia: B1

PII: S1878-6146(19)30169-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.010>

Reference: FUNBIO 1093

DIFFERENCES IN GENE MODULATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INDICATE THAT MATURITY PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE HIGH HYDROSTATIC PRESSURE STRESS RESPONSE AND RESISTANCE

DIFFERENCES IN GENE MODULATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INDICATE THAT MATURITY PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE HIGH HYDROSTATIC PRESSURE STRESS RESPONSE AND RESISTANCE

ABSTRACT

There is a strong relationship between the regulatory pathways to oxidative stress, longevity, and aging. High hydrostatic pressure (HHP) induces oxidative stress and activates cellular defense mechanisms. The understanding of these mechanisms is a strategy to delay damage associated with aging. Addressing resistance to stress and aging in *Saccharomyces cerevisiae* is a well-accepted approach since pathways involved in energy balance, damage accumulation and stress response are preserved among eukaryotes. The purpose of this study was to correlate the environmental stress response to cell maturity. HHP stress response on *S. cerevisiae* mother and daughter cells was evaluated through survival, reactive oxygen species (ROS) accumulation and gene expression. Mature cells were yeasts that had budded and originated at least one descendant, and young cells were the ones that did not form a bud. Mature cells were more resistant to HHP, although they showed a decrease in expression of antioxidant enzymes genes, and a higher intracellular levels of ROS. Young cells had less resistance to HHP despite a tendency of positively regulating these same antioxidant encoders. The TOR1 gene, related to aging and apoptosis, was unchanged in mother cells and showed a tendency toward increased expression in daughter cells submitted to HHP. The gene modulation differences of the mother and daughter cells indicates that maturity plays an important role in the HHP stress response and resistance. Thus, even accumulating high levels of ROS, mature cells were more tolerant to HHP stress and survived better, despite aging.

Keywords: Yeast, mother cells, daughter cells, stress tolerance, aging

5.1 INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae is an important model organism in biology. Many yeast genes are surprisingly conserved among eukaryotes, and this similarity can be useful to understand cell behavior of different organisms, including humans (Botstein et al., 1997). In this context, these microorganisms are also a reference in stress resistance and aging studies of eukaryotes, since they reveal the preservation of energy balance, accumulation of damages, and stress response (Hasty et al., 2003; Karathia et al., 2011). The stress response mechanisms are believed to protect cells from molecular damage by activating repair mechanisms that direct the cell to a metabolic adjustment. This will lead to the survival in the new environmental condition (Hohmann, 2002; Toledano et al., 2003).

Oxidative stress is defined as a disturbance that promotes an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defenses (Toledano et al., 2003). ROS are normal products of cellular metabolism and at low levels have beneficial effects, as they activate signaling pathways to produce molecules that protect against stress. However, at high levels ROS can be toxic and lead to death (Zadrag-Tęcza et al., 2018). In addition, the progressive accumulation of ROS is associated with oxidative damage to DNA and other cellular structures and reduction of metabolic functions, which lead to cell aging (Fontana et al., 2010; Lippuner et al., 2014).

High hydrostatic pressure (HHP) is a tool to study stress response in yeast. HHP causes changes in cell volume, inducing compression of cells and their internal components, thus altering many biochemical and physiological activities, such as cell division, protein folding, enzyme activity, and lipid bilayer conformation (Fernandes, 2005). Moreover, HHP induces oxidative stress in yeast (Bravim et al., 2016). *S. cerevisiae* cells acquire tolerance to severe HHP stress and to other types of stresses, such as heat, cold, and ethanol when subjected to a sublethal treatment of 50 MPa for 30 min followed by a short recovery time at ambient pressure of 0.1 MPa for 15 min (Bravim et al., 2013; Palhano et al., 2008; Palhano et al., 2004a). HHP may contribute to studies related to stress tolerance and aging, because it induces oxidative stress, causing accumulation of ROS inside the cells, and ROS are associated with the aging process (Harman, 1956).

Maturity is a very important process in the life of a cell, as it is when the cell reaches the final differentiation stage, achieving its fully functional capacity to reproduce and generate descendants. At birth and at the start of the reproductive cycle, every living organism, be it unicellular or pluricellular, has an average life span characteristic of its species. Considering the life span of the population, the concept of longevity refers to the life expectancy of an organism of a given species. Thus, extension of longevity is a statistical prediction of an extension of the life span of an organism or group above an already known average (Wang-michelitsch e Michelitsch, 2015).

Aging can be defined as a reduction or loss in the ability to adapt to an environmental stress in response to the decay in intrinsic physiological function with increasing age (Flatt, 2012). Decreased maintenance of cell repair mechanisms causes a progressive accumulation of damage to important structures such as nucleic acids, proteins, and lipids; such changes lead to aging (Rattan, 2006). Therefore, the causes of aging are multifactorial, and the metabolic and molecular pathways that regulate this process among eukaryotes are conserved. Although results of aging studies on model organisms should be viewed with caution when related to human, much of the understanding about the conserved pathways involved in aging has been obtained from experiments with model organisms (Ludovico et al., 2012). This makes *S. cerevisiae* an important model and addressing resistance to stress and aging in this organism is a well accepted approach, because the pathways involved in energy balance, damage accumulation, stress response, genomic integrity, apoptosis are conserved in eukaryotes (Karathia et al., 2011).

Thus, the purpose of this study was to correlate the environmental stress response caused by high hydrostatic pressure (HHP) to cell maturity. By separating mother and daughter cells, important differences in the stress response mechanisms can be observed, including expression of genes related to aging and antioxidant defenses as well as ROS accumulation.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 YEAST STRAINS AND GROWTH CONDITIONS

Two *S. cerevisiae* yeast strains were used in this study, the wild-type (WT) S288C and the mutant UCC5181 Mat α ade::hisG leu2 met15D::ADE2 trp1D63 ura3D0 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2-loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX. The UCC5181 strain is the result of a genetic modification of its parental S288C, as described in (Lindstrom e Gottschling, 2009), kindly donated to this study. The genetic modification allows the sterility of newborn daughter cells in estradiol-containing culture medium without affecting the replication of the mother cells. Cells were grown at 28 °C with aeration in liquid YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) to an exponential phase of approximately OD_{600nm} of 0.7. A new culture stock was used for each batch. Solid medium was supplemented with 2% agar.

5.2.2 STRESS CONDITION

HHP was achieved using a laboratory equipment as previously described in Bravim et al. (2010). Briefly, yeast suspensions were placed inside a 4 mL teflon tube without air bubbles at room temperature. HHP was applied to the piston-cylinder and measured with a calibrated mechanical manometer. Yeast cells were submitted to a pretreatment of 50 MPa for 30 min, incubated at room pressure (0.1 MPa) with aeration shaking for 15 min, followed by severe treatment of 100 MPa for a further 30 min (acclimation treatment). Viability was determined by plating the appropriate dilution of cells on YEPD plus 2% agar. After incubation for 72 h at 28 °C, cell survival was calculated by comparing the colony forming units (cfu) of treated versus untreated samples. All experiments were performed in duplicate and reproduced at least three times; mean values were calculated.

5.2.3. PURIFICATION OF MOTHER CELLS

For mother and daughter cells separation, the cells were centrifuged and washed with PBS (phosphate buffered saline), labeled with biotin and streptavidin, bound to electromagnetic microbeads, and then transferred to a new culture medium. Estradiol was added at a final concentration of [1 μ mol.L⁻¹] and cells were grown until approximately OD_{600nm} of 1.4. Cells generated in the new culture medium were born without cell surface labeling and were sterile, designated as daughter cells (protocol adapted from Lindstrom e Gottschling, 2009).

Immediately after the HHP treatment described above, the samples were kept on ice and fixed with 4% paraformaldehyde solution. To separate the mother cells from the young daughter cells, the affinity chromatography method was performed using the Multistand Macs Kit and Magnetic Columns for separation (Miltenyi Biotec, Massachusetts, USA). Because it is an electromagnetic column, the mother cells that have magnetic microbeads on the cell surface were retained in the column, while the daughter cells eluted easily through the column and were collected in a test tube. After this procedure, the cells were stored in a freezer at -20 °C for RNA extraction. The purity of the samples was confirmed by optical microscopy (data not shown). Mother cells were formed yellowish lumps (due to the cell surface marking), and the daughter cells were observed in isolated and unmarked forms.

5.2.4 GENE EXPRESSION CONFIRMATION BY REAL TIME RT-PCR

Total RNA of yeast cells was extracted with phenol/chloroform and precipitated with 3 mol.L⁻¹ sodium acetate/absolute ethanol as previously described in Palhano et al. (2004b). Samples were treated for 10 min with 0.5 U of RNase-free DNase I/ μ g RNA. cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Reactions were carried out in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Software download v. 2.0.6, Applied Biosystems, USA). Calibration curves and relative expression levels were performed as described in Bravim et al. (2013). For each gene, calibration curves with serial dilutions of cDNAs were obtained to determine amplification efficiency. Relative expression levels were obtained through the calculation of $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{treatment} - \Delta Ct_{control})$ and the acquired data were normalized to ALG9 (Asparagine-Linked Glycosylation 9 gene) expression levels. The oligonucleotides used as primers in the qRT-PCR

reaction, listed in Table 3, were designed with the aid of the Primer Express 3.0 (taq®MGB quantification), Primer 3 Plus, and the Saccharomyces Genome Database.

The gene expression was analyzed in mother and daughter cells, untreated and after the HHP treatment. Data expression was presented as log fold changes \pm SE.

Genes	Sequence of primer	Amplicon size (pb)	Efficiency
<i>TOR1</i>	Forward: AGATGCTGGGGTCGCAAAA Reverse: AGCATGGGAGGGTGACTCT	100	101
<i>RAS2</i>	Forward: TCCAGCCATGCAAGCAAAG Reverse: TCCCGGGATAAAGGAACCA	65	91
<i>SCH9</i>	Forward: TCCAGCCATGCAAGCAAAG Reverse: TCCCGGGATAAAGGAACCA	129	104
<i>SGS1</i>	Forward: GGCAGGCGGATGAGATACAA Reverse: CACGGCCGGTTTCTTGATA	134	105
<i>SIR2</i>	Foward: TAAAGCTGCGCTCGGAGAA Reverse: CACTGCCAAGGGATCCATGT	69	99
<i>CTT1</i>	Forward: ACGGCCCTATCTTACTGAA Reverse: TACACGCTCCGGA ACTCTTT	79	95
<i>SOD2</i>	Forward: AACCAGGATACCGTCACAGG Reverse: TTCCAGTTGACCACATTCCA	130	95
<i>ALG9*</i>	Forward: ACATCGTCGCCCAATAAAT Reverse: GATTGGCTCCGGTACGTAAA	145	96

*Reference gene

Table 1: Oligonucleotides used as primers in the qRT-PCR reaction.

5.2.5 MEASUREMENT OF ENDOGENOUS REACTIVE OXYGEN ESPECIES (ROS)

The ROS accumulation in mother and daughter cells were analyzed with fluorescence labeling and flow cytometry analysis using the CM-H2DCFDA (Sigma, 2 Missouri, USA) fluorescence probe, a general oxidative stress indicator. The readings were performed using the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) with blue at 488 nm excitation laser. To accurately distinguish mother and daughter cells and conduct the analysis by flow cytometry, the Calcofluor White Stain dye (Fluka Analytical, Missouri, USA) was used to “tag” the mother cells. Therefore, an inoculum was prepared until the cells reached approximately DO600 of 5.0. The cells were then pelleted and stained rapidly with calcofluor and reinoculated in the culture medium with addition of estradiol [$1 \mu\text{mol.L}^{-1}$] to generate non-replicating daughter cells. In this way, the mother cells could be distinguished from the daughter in the cytometer, not only by size (FSC), but also by a greater complexity precision (SSC), since the calcofluor adheres to chitin in the yeast cell wall, which is thicker in mother cells. Tests were performed, and the calcofluor does not interfere with the response to the stress generated or the emission of the dye fluorescence to ROS. All experiment were reproduced at least three times and 20,000 events were collected in each experiment.

The accumulation of ROS in mother and daughter cells was analyzed in untreated samples and at each HHP treatment step. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ($P < 0.05$).

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 MATURITY INFLUENCES THE SURVIVAL OF *S. CEREVISIAE* UCC5181 STRAIN TO HHP

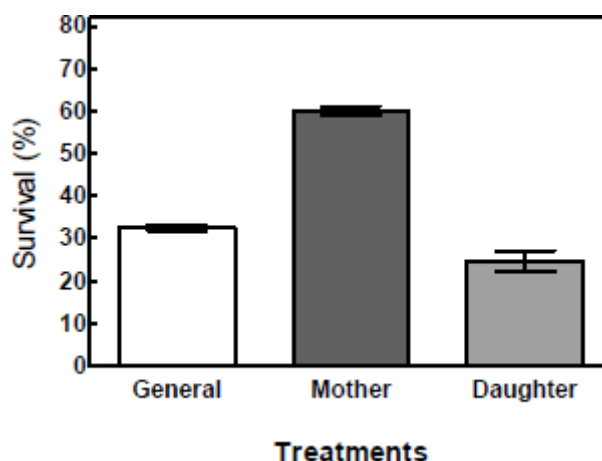


Figure 1: HHP survival of *S. cerevisiae* UCC5181 cells. Survival of the UCC5181 mutant strain in the logarithmic growth phase ($OD_{600nm} = 1.0$) subjected to HHP of 50 MPa for 30 min, followed of 15 min at room pressure (0.1 MPa), followed of 100 MPa for 30 min. General population of cells was used as a control (white column), mother cells (middle gray column), daughter cells (light gray column). Separate analysis of the mother and daughter cell populations found that the survival percentage of the mother cells is almost three times higher than the daughter cells. Error bars represent the SD of three independent measurements in duplicate.

To certify that the mutation of UCC5181 would not interfere in the cell response to HHP, survival tests were performed with the UCC5181 strain and its parental S288c (data not shown). Both strains were submitted to a sublethal pretreatment of 50 MPa for 30 min, followed by 15 min incubation in shaking at ambient pressure (acclimation treatment), ending with the severe stress of 100 MPa for 30 min. The tests proved that the UCC5181 mutation did not interfere with the ability of the yeast cells to respond to the HHP stress.

Adding estradiol to the UCC5181 strain keeps the daughter cells arrested in the G1 phase of the cell division while mother cells continue to replicate normally (Lindstrom e Gottschling, 2009). Therefore, for our analysis, mother cells were yeasts

that had budded and originated at least one descendant, and daughter cells were the ones that did not form a bud.

Moreover, the maturity of the mother cells showed to be very important for the tolerance to the HHP stress. Mother and daughter cells displayed a distinctive survival pattern when submitted to HHP stress of 100 MPa after the acclimation treatment. Daughter cells had a survival rate of approximately 25%, whereas mother cells resisted almost three times more than young cells to HHP stress (Fig. 1).

HHP alters the cell structural architecture, the membrane fluidity and the organelles, induces polymerization and denaturation of proteins and this interferes with the enzymatic activity of the cell (Fernandes, 2005). During maturation, mother cells might have the opportunity to synthesize and accumulate cell wall and membrane structural components necessary to confer resistance to HHP. This may have contributed to the higher tolerance of mature cells to HHP.

Pressure pretreatment of 50 MPa for 30 min alone does not induce tolerance to high pressures (Fernandes et al., 1997), but brief incubation at atmospheric pressure following pressure treatment renders *S. cerevisiae* wild-type cells at the early exponential growth tolerant to high pressure such as 100 MPa (Palhano et al., 2004a). Similarly, the UCC5181 strain was more tolerant to HHP when exposed to the same stress conditions (data not showed).

5.3.2 ROS PRODUCTION AFTER HHP TREATMENT

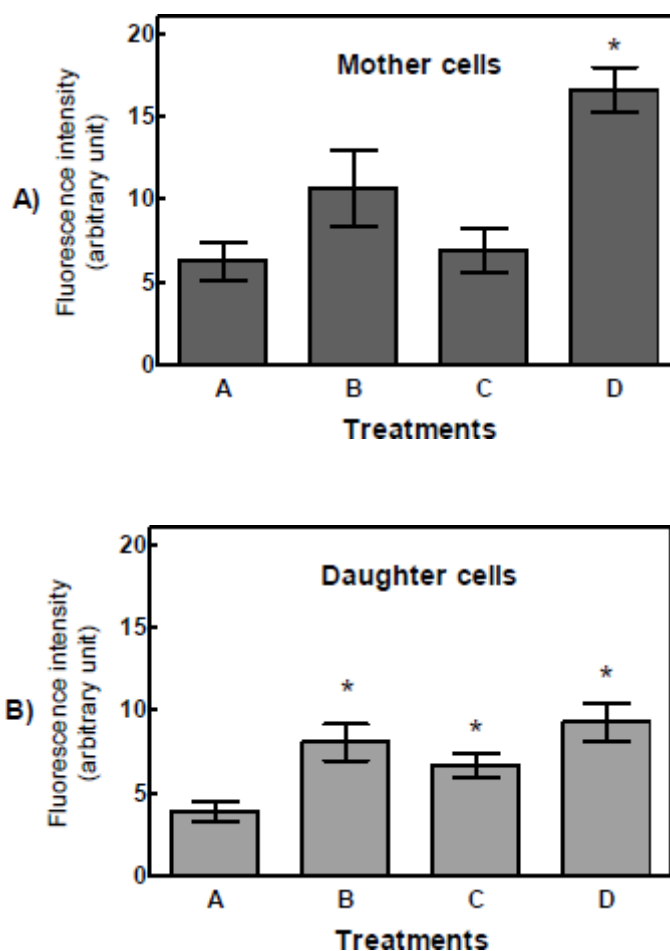


Figure 2: Reactive Oxygen Species accumulation in mother and daughter cells submitted to HHP. ROS production in mother and daughter cells of mutant UCC5181 submitted to HHP stress of 50 MPa for 30 min, followed of 15 min at room pressure (0.1 MPa), followed of 100 MPa for 30 min. The cells were treated in the logarithmic growth phase ($OD_{600nm} = 1.0$). The control was untreated cells (a). Cells were treated with 50 MPa for 30 min (b), followed by 15 min at acclimatization of 0.1 MPa (c), followed by 100 MPa for 30 min (d). Aliquots were drawn to analyze ROS accumulation on a flow cytometer at each treatment point. In the mother cells, points (b) and (c) were not significant in relation to control (a), only point (d) showed a significant increase in ROS accumulation in relation to control. In the daughter cells, all treatment points analyzed (b, c, and d) had a significant increase in ROS accumulation in relation to the control (a). Error bars represent the SD of three independent measurements in triplicate. The data were analyzed using One-way analysis of variance ($p < 0.05$). * Indicates significant values.

The accumulation of ROS in UCC5181 strain after HHP treatment was analyzed (Fig. 2) and compared with cell survival (Fig. 1). Previous work has concluded that HHP induces oxidative stress, leading to an accumulation of ROS in cells. This

accumulation induces increased regulation of antioxidant genes, which is related to increased hydrostatic pressure stress tolerance (Bravim et al., 2016). However, analysis performed separating mother and daughter cells showed that they differentially accumulated free radicals (Fig. 2). Surprisingly, mature cells accumulated high concentration of ROS after 100 MPa with acclimation (Fig. 2A) but resisted almost three times more than young cells to the stress in question (Fig. 1). Daughter cells accumulated less ROS (Fig. 2B) but exhibited less resistance to HHP (Fig. 1).

Mature cells did not significantly increase ROS levels after 50 MPa for 30 min. However, they accumulated almost three times more ROS after 100 MPa for 30 min (Fig. 2A). ROS significantly accumulate in the young cells after 50 MPa for 30 min, in addition they did not return to normal ROS levels after acclimation (Fig. 2B). Meanwhile the young cells accumulated less ROS than mature cells after severe stress (Fig 2). Mature cells presented greater ROS accumulation than young cells before HHP stress started (Fig. 2). We believe this is related to the better stress response of mature cells to HHP stress. According to Zdraǵ-Tęcza et al. (2018), slightly elevated levels of ROS activates signaling pathways to produce molecules that protect against stress.

The theory of oxidative species accumulation is one of the most accepted in relation to the aging process due to the innumerable evidence about the relationship between biomolecule injuries and attack of important cellular structures. Damage to such molecular structures leads to cellular functional decline and increases the probability for death (Höhn et al., 2017). Looking at the aging side, the high accumulation of ROS observed in mature cells after HHP may be related to the continuity of the aging process, despite the better tolerance to stress.

Our results suggested that antioxidant defenses are not the main defense mechanisms of cells against HHP stress. ROS accumulation is related to oxidative damage to lipid, proteins, and peroxidation of other molecules and also contributes to cell aging (Chen et al., 2017). However, mature cells showed a better resistance to HHP than the young cells despite the high accumulation of ROS. This indicates the importance of maturity in the induction of defense mechanisms against HHP stress, even in the face of conditions considered favorable to damage and aging.

5.3.3 GENE EXPRESSION AFTER HHP TREATMENT

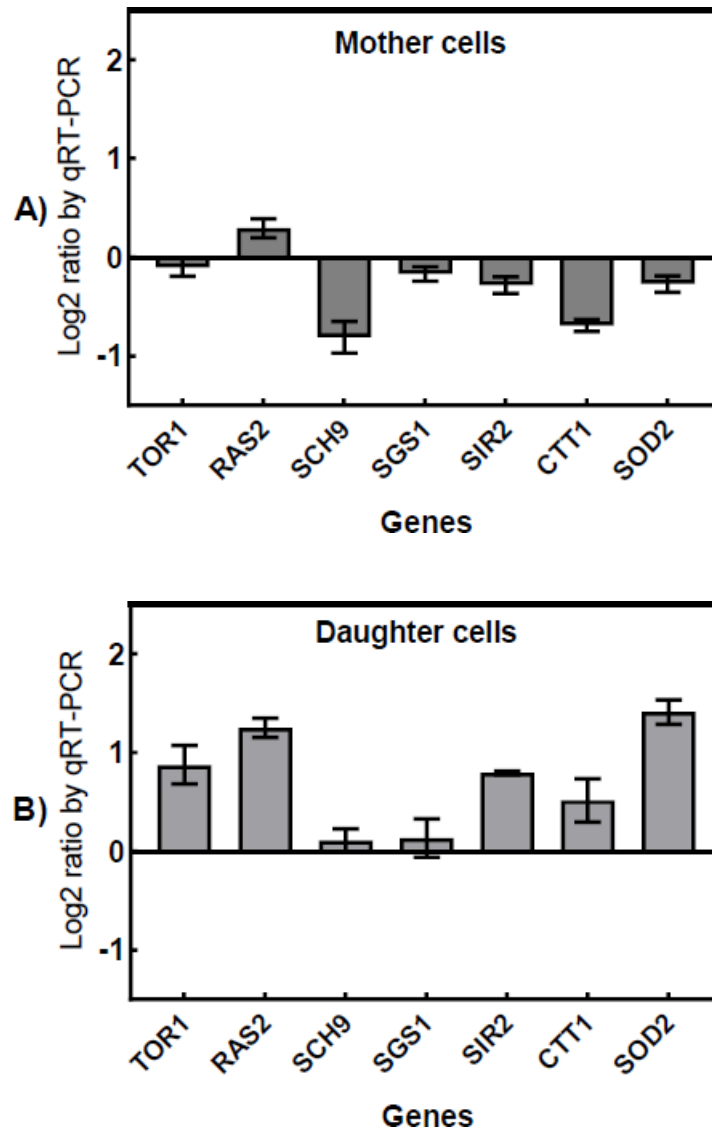


Figure 3: Relative expression of mother and daughter cells after HHP. qRT-PCR expression levels in mother (A) and daughter cells (B) of mutant UCC5181 submitted to HHP stress of 50 MPa for 30 min, followed of 15 min at room pressure (0.1 MPa), followed of 100 MPa for 30 min. The log2 fold change relates the relative expression of mother and daughter cells after complete treatment of HHP vs. control (mother and daughter cells untreated). The relative expression of mother and daughter cells was calculated in relation to the control of each one. The data have been normalized with the *ALG9* gene. Mother cells did not alter expression of *TOR1*, showed a slight tendency toward increased expression of *RAS2*, and to decrease of expression *SCH9*, *SGS1*, *SIR2*, *CTT1*, and *SOD2*. Daughter cells showed a tendency toward increased expression of most of the genes, except *SCH9* and *SGS1*, which were not regulated. Data exhibited are log2 fold values \pm SE of two independent replicates.

Genes involved in stress response, longevity, and aging were selected to analyze transcription in response to HHP in *S. cerevisiae* mother and daughter cells (Fig. 3). Gene regulation was also related to ROS accumulation and cell tolerance to HHP stress. It is known that HHP alters the regulation of several genes and transcription factors involved with energy and respiratory metabolism, in addition to restarting the cell cycle. The objective of these changes is to divert the cellular metabolism to the defense mechanisms against stress (Bravim et al., 2012).

The TOR1 (target of rapamycin 1) gene is an important transcriptional regulatory gene capable of emitting signals to activate or inhibit other genes, and it is implicated with metabolism, cell growth and proliferation, and appears to be involved with chronological aging (Evans et al., 2010; Swinnen et al., 2014). TOR1 was not altered by HHP stress in the mother cells (Fig. 3A); however, the HHP showed a tendency toward increased expression of this gene in the daughter cells (Fig. 3B). The overexpression of TOR kinase domain in *Arabidopsis* displayed development abnormalities and senescence (Ren et al., 2011). Therefore, HHP appeared to be leading daughter cells to an early maturity in an attempt to cope with this stress.

Inhibition of mTOR targets (mechanistic target of rapamycin) has been shown to extend the life span of several organisms, although the exact mechanisms of this regulation are not yet clear (Finkel, 2015). Overexpression of TOR reduces cell size and inhibits proliferation in *Dictyostelium discoideum* (Swier et al., 2016). Stability of the TOR1 gene in mature cells was related to the tolerance to HHP evidenced by increased survival of the mother cells (Fig. 1), corroborating with the inhibition studies of the mTOR targets reported by Finkel (2015). On the other hand, the tendency toward increased expression of this gene in the daughter (Fig. 3B) was related to reduced resistance and survival to HHP (Fig. 1), because mTORC1 overactivation directs senescence and death in mammalian cells (Aramburu et al., 2014).

mTOR1 is sensitive to several stress factors such as hypoxia, DNA damage, oxidative and osmotic stress, because it influences the biosynthesis of proteins, lipids, and nucleic acids in response to growth-promoting signals (Bonawitz et al., 2007; Ortells et al., 2012). Inhibition/deletion of TOR1 signaling pathway prolongs the life span of several model organisms and the replicative life chronological (RLC) in *S. cerevisiae*, delaying the aging independent of the antioxidant gene SOD2 (mitochondrial manganese superoxide dismutase) in a glucose-rich medium (Bonawitz et al., 2007). In this work, TOR1 was not altered and SOD2 showed a tendency toward

decreased expression by HHP in mother cells, and they survived almost three times more than daughter cells (Fig. 1) that showed a tendency toward increased of both genes (Fig. 3B). Our results demonstrated that differences in survival rates of mature and young cells were influenced by the regulation of TOR1 independent of SOD2 regulation, as mentioned above for RLC.

Mother cells presented a tendency toward decreased expression of CTT1 (cytosolic catalase T1), which confer protection against oxidative damage by hydrogen peroxide (Grant et al., 1998). We attributed the high accumulation of ROS in mature cells (Fig. 2A) the tendency toward decreased expression of SOD2 and CTT1 genes (Fig. 3A). On the other hand, daughter cells displayed a tendency toward increased expression of SOD2 and CTT1 antioxidant genes, thus, low accumulation of ROS (Fig. 2B). Therefore, we conclude that antioxidant defenses were not the main defense mechanism against HHP stress.

Inhibition of the mTOR pathway is associated with lipid and protein synthesis and contributes to the longevity of several model organisms (Antikainen et al., 2017). Lipids and proteins are the main constituents of the membrane and cellular organelles, control the fluidity, and guarantee protection to the cell. Stability of TOR1 in mature cells (Fig. 3A) appears to have secured this protection against HHP, allowing these cells to survive longer, despite the high accumulation of ROS (Fig. 2A). Evidence suggest that young cells did not achieve the same protection because they had a tendency to upregulate of TOR1 (Fig. 3B). The reasons that led to the different regulation of TOR1 between mother cells and daughters are not clear. However, it seems that the difference in the antioxidants regulation is related to the regulation of the TOR pathway, since other studies report that this transcriptional regulator controls the activity of other genes, mainly the ones involved with metabolism (Evans et al., 2010).

We also analyzed RAS2 (a GTP-binding protein coding gene), as it has been suggested that RAS2/cAMP increases mitochondrial activity by loss of the mitochondrial membrane potential, which could result in increased ROS production in the cells. RAS also acts on cAMP signaling induced by the presence of glucose (Conrad et al., 2014). Our assays were performed in a glucose-rich medium, and ROS levels were elevated with HHP treatment in mother and daughter cells (Fig. 2), indicating increased respiratory activity.

The RAS2 gene is involved in the production of G protein/GTPases, which are cell surface markers with important roles in controlling metabolism, proliferation, differentiation, apoptosis, and cell senescence. The hyperactivation of RAS2 pathway signaling is highly oncogenic in the orthologous gene of higher eukaryotes and induces the formation of pseudohyphas in yeasts and disordered cell proliferation. On the other hand, its deletion has been shown to extend the RLC in yeast (Broggi et al., 2013; Slack et al., 2015). Similar to the TOR1 gene, the regulation of RAS2 was also altered by HHP in mother and daughter cells (Fig. 3). Nevertheless, this tendency toward increased expression was much more evident in the daughter cells (Fig. 3B). The tendency toward increased expression of RAS2 gene in the young cells was almost four times higher than in the mature cells (Fig. 3). Because it is a transcriptional factor related with metabolism process, the increased transcription of RAS2 gene in the young cells may have caused a metabolic disorder that lead to lower resistance of young cells to HHP stress. This corroborates with the hyperactivation results of the RAS2 pathway previously described (Broggi et al., 2013; Slack et al., 2015).

SCH9 (AGC family protein kinase) is involved in regulation of sphingolipid biosynthesis, cell aging, and responses to both oxidative and osmotic stresses. The Sch9 protein serine/threonine kinase is phosphorylated by Tor1p and activates aging signals to TOR1 pathway and is, therefore, considered one of the key regulators of longevity and aging in yeast (Qie et al., 2015; Urban et al., 2007). Deletion of this gene is important to reduce the levels of ubiquitinated proteins, which are proteins with conformation defects, must be removed from the cell, and have an important role in the control of longevity. In addition, the SCH9 pathway increases mitochondria respiration during growth promoting superoxide generation (Qie et al., 2015). Although, mother and daughter cells have accumulated superoxides that suggests activation of stress response with modulation of protein kinases, the HHP showed a tendency toward decreased expression of SCH9 in mature cells and did not change the expression in young cells (Fig. 3). Therefore, the decrease in transcription of SCH9 in mature cells indicated that they were favored by activity of ubiquitins to repair unfolded proteins and this helps longevity.

SGS1 (Slow Growth Suppressor 1) belongs to the RecQ-helicases nucleolar DNA family and is very important to maintain genomic integrity, as well as to prevent and repair DNA damage. The deletion of SGS1 in *S. cerevisiae* exhibits phenotypes of early aging due to genomic instability. Generally, the expression of this gene

increases during life but reduces when senescence begins. For this reason, this gene is considered very important for longevity promotion (Bernstein et al., 2010). Mother cells showed a slight tendency toward decreased expression of SGS1, while the expression in daughter cells was not altered after HHP treatment (Fig. 3). Thus, *S. cerevisiae* cells could undergo DNA damages caused by free radical accumulation after HHP stress (Fig. 2), contributing to aging. However, the DNA of young cells was less exposed to oxidative damage than mature cells, because they showed a tendency toward increased expression of the antioxidants CTT1 and SOD2 accumulating less ROS (Fig. 2B). This may have favored the longevity of young cells that resisted HHP stress.

Mother cells showed a tendency toward decreased expression of the analyzed genes, except for RAS2 that showed a slight tendency toward increased expression (Fig. 3A). The high accumulation of ROS, caused by lower expression of antioxidants, leads to damage of important molecules. However, the tendency toward decreased expression of SCH9 could increase the levels of ubiquitins, which prevents unfolded or proteins accumulation favoring longevity. Daughter cells showed a tendency toward increased expression of most genes, except SCH9 and SGS1, which were not regulated. The association of ubiquitins and req-helicases deficiency would favor accumulation of unfolded proteins and DNA damage in these cells; however, the upregulation of CTT1 and SOD2 leads to a lower ROS accumulation, which partly compensates for the deficiency of these proteins. Besides this, the tendency toward increased expression of TOR1 and RAS2 disfavored the young cells, because even the tendency toward increased expression of antioxidants and lower accumulation of ROS were not enough to make them as tolerant to HHP stress as mature cells.

SIR2 (Silent Information Regulator) is a gene encoding sirtuin protein. The sirtuins belong to a phylogenetically conserved family of proteins that promote histone deacetylation in the presence of NAD⁺, regulating the genomic silencing of telomeres, largely by reducing the harmful effects of extrachromosomal rDNA accumulation, which is associated with aging (Lin et al., 2000). The requirement for NAD⁺ renders SIR2 potentially prone to regulation by fluctuations in the level of this molecule or intermediates of cellular metabolism. SIR2 is considered a pro-longevity factor in *S. cerevisiae*, since its deletion reduces the replicative life span (RLS), while its upregulation promotes the extension of the RLS (Wierman e Smith, 2014).

Many studies have shown the involvement of SIR2 in the extension of the longevity in stress induced by caloric restriction and in proliferative growth phase in

yeasts and higher eukaryotes (Dali-Youcef et al., 2007; Lu e Lin, 2010; Wierman e Smith, 2014). However, the stress used in our study, HHP, was conducted in glucose-rich medium and causes cell cycle arrest. Yeast mother cells displayed a slight tendency toward decreased expression in SIR2 after HHP (Fig. 3A). Meanwhile, the importance attributed to the upregulation of SIR2 in telomere repair and extension of RLS may not have been relevant because the mother cells were not dividing, so there would be no reason for producing this protein. On the other hand, SIR2 showed a tendency toward increased expression in the daughter cells (Fig. 3B). The reasons for this tendency toward increased expression of SIR2 in daughter cells are unclear; however, it appears to be related to TOR1 and RAS2 tendency toward increased expression.

Previous microarray analysis show that HHP alters the regulation of several genes and transcription factors involved with energy and respiratory metabolism. TOR1, SCH9, RAS2, SIR2, CTT1 and SOD2 genes were changed and only SGS1 gene was not changed by HHP in this microarray analysis (Bravim et al., 2012). Our data showed similar results with these same genes (Fig. 3). We observed in the present study that small differences in genes expression caused large physiological differences in the yeast stress response, evidenced by differences in ROS production (Fig. 2) and survival (Fig.1) of *S. cerevisiae* mature and young cells, as previously discussed.

5.4 CONCLUSIONS

This work found that mother and daughter cells of *S. cerevisiae* respond differently to HHP stress. TOR1 gene was not altered and RAS2 was slight upregulated in mature cells. Young cells showed a tendency toward decreased expression of both genes. Different regulation of these transcription factors interfered in stress tolerance to HHP. Stability of TOR1 was associated to a higher resistance of the mother cells to HHP stress. While the tendency toward increased expression of TOR1 and RAS2 was associated with lower resistance of the daughter cells. Although, they showed a tendency toward increased expression of CTT1 and SOD2 antioxidants and accumulated less free radicals, this was not enough for them to resist HHP stress better. Maturity favored stability of TOR1 gene and the showed tendency toward decreased expression of SCH9, which were important to HHP resistance and longevity in mature cells, although they accumulate more ROS. Thus, the tendency toward decreased expression of an aging gene was more important than the tendency increased expression of antioxidants gene to resist and survive HHP stress.

HHP showed a tendency to alter the expression of TOR1 and RAS2, and not only the pathway of activation of these genes. This novelty makes new studies possible that involve pressure and these important genes. This work reinforces the importance of studies with model organisms such as *S. cerevisiae* to improve the knowledge of the biochemical and molecular mechanisms involved in stress response and aging of the eukaryotes, because this will contribute to the prevention of diseases related to the natural process of cell aging. Thus, we conclude that even accumulating high levels of ROS, mature cells were more tolerant to HHP stress and presented a better survival, despite aging.

In general, to understand the cellular functions of mTOR pathway, its inhibition is obtained by rapamycin treatment or by molecular techniques, such as gene deletion or overexpression (Bonawitz et al., 2007; Ren et al., 2011). However, our work showed that HHP showed a tendency toward increased expression TOR1 in daughter cells. Thus, the biotechnological applications of HHP may be expanded to other studies besides aging, such as survival in response to nutritional changes and growth, also regulated by the mTOR pathway.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant 458029/2014-9 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) grants 76437906/16 and 80598609/17. P.M.B. Fernandes acknowledge CNPq for her research productivity award (303432/2018-7). This article is part of the Fungal Adaptation to Hostile Challenges special issue for the third International Symposium on Fungal Stress (ISFUS), which is supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant 2018/20571-6 and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant 88881.289327/2018-01.

REFERENCES

- Antikainen, H., Driscoll, M., Haspel, G., Dobrowolski, R., 2017. TOR-mediated regulation of metabolism in aging. **Aging Cell.** 16, 1219–1233. <https://doi.org/10.1111/ace1.12689>
- Aramburu, J., Ortells, M.C., Tejedor, S., Buxadé, M., López-Rodríguez, C., 2014. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. **Sci. Signal.** 7, 1–11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005326>
- Bernstein, K., Gangloff, S., Rothstein, R., 2010. The RecQ DNA helicases in DNA Repair. **Rev Genet.** 44, 393–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163602>
- Bonawitz, N.D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., Shadel, G.S., 2007. Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. **Cell Metab.** 5, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.009>
- Botstein, D., Chervitz, S.A., Cherry, M., 1997. GENETICS: Yeast as a Model Organism. **Science.** 277, 1259–1260. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1259>
- Bravim, F., Lippman, S.I., Da Silva, L.F., Souza, D.T., Fernandes, A.A.R., Masuda, C.A., Broach, J.R., Fernandes, P.M.B., 2013. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97, 2093–2107. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4356-x>
- Bravim, F., Mota, M.M., Fernandes, A.A.R., Fernandes, P.M.B., 2016. High hydrostatic pressure leads to free radicals accumulation in yeast cells triggering oxidative stress. **FEMS Yeast Res.** 16, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow052>
- Bravim, F., Silva, L.F., Souza, D.T., Lippman, S.I., James, R., Fernandes, A.A.R., Fernandes, P., 2012. High hydrostatic pressure activates transcription factors involved in *Saccharomyces cerevisiae* stress tolerance. **Curr Pharm Biotechnol.** 13, 2712–2720. <https://doi.org/10.2174/138920112804724891>
- Broggi, S., Martegani, E., Colombo, S., 2013. Nuclear Ras2-GTP controls invasive growth in *saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One.** 8, e79274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079274>
- Chen, F., Liu, Y., Wong, N.K., Xiao, J., So, K.F., 2017. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. **Cell Transplant.** 1483–1495. <https://doi.org/10.1177/0963689717735407>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** 38, 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2007. Sirtuins: The “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. **Ann. Med.** 39, 335–345. <https://doi.org/10.1080/07853890701408194>

- Evans, D.S., Kapahi, P., Hsueh, W.C., Kockel, L., 2010. TOR signaling never gets old: Aging, longevity and TORC1 activity. **Ageing Res. Rev.** 10, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.04.001>
- Fernandes, P.M.B., 2005. How does yeast respond to pressure? **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 38, 1239–1245. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000800012>
- Finkel, T., 2015. The metabolic regulation of aging. **Nat. Med.** 21, 1416–1423. <https://doi.org/10.1038/nm.3998>
- Flatt, T., 2012. A new definition of aging? **Front. Genet.** 3, 1–2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00148>
- Fontana, L., Partridge, L., Longo, V.D., 2010. Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. **Science.** 328, 321–326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Grant, C.M., Perrone, G., Dawes, I.W., 1998. Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 253, 893–898. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9864>
- Harman, D., 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.** 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H., Vijg, J., 2003. Aging and Genome Maintenance: Lessons from the Mouse? **Science.** 299, 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1079161>
- Hohmann, S., 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66, 300–372. <https://doi.org/10.1128/mubr.66.2.300-372.2002>
- Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., Castro, J.P., 2017. Happily (n) ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biol.** 11, 482–501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Alves, R., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. **PLoS One.** 6, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Lin, S.J., Defossez, P. a Guarente, L., 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science.** 289, 2126–2128. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2126>
- Lindstrom, D.L., Gottschling, D.E., 2009. The mother enrichment program: A genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.** 183, 413–422. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106229>
- Lippuner, A.D., Julou, T., Barral, Y., 2014. Budding Yeast as a Model Organism to Study the Effects of Age. **FEMS Microbiol. Rev.** 38, 300–25. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12060>

- Lu, S.P., Lin, S.J., 2010. Regulation of yeast sirtuins by NAD⁺ metabolism and calorie restriction. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1804, 1567–1575. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.030>
- Ludovico, P., Osiewacz, H.D., Costa, V., Burhans, W.C., Goethe-universit, J.W., 2012. Cellular Models of Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2012/616128>
- Ortells, M.C., Morancho, B., Drews-Elger, K., Viollet, B., Laderoute, K.R., López-Rodríguez, C., Aramburu, J., 2012. Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. *Nucleic Acids Res.* 40, 4368–4384. <https://doi.org/10.1093/nar/gks038>
- Palhano, F., Gomes, H., Orlando, M.T., Kurtenbach, E., Fernandes, P.M., 2004. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. *Cell. Mol. Biol.* 50, 447–457. <https://doi.org/10.1170/T533>
- Palhano, F.L., Foguel, D., Lindsey, G.G., Fernandes, P.M., 2008. Changes in Transcription and Protein Profile Induced by High Hydrostatic Pressure Treatment in Micro-Organisms. *Curr. Proteomics.* 5, 138–145. <https://doi.org/10.2174/157016408784911909>
- Palhano, F.L., Orlando, M.T.D., Fernandes, P.M.B., 2004. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.02.002>
- Qie, B., Lyu, Z., Lyu, L., Liu, J., Gao, X., Liu, Y., Duan, W., Zhang, N., Du, L., Liu, K., 2015. Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. *Redox Biol.* 5, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.002>
- Rattan, S.I.S., 2006. **Biological Causes of Aging and Age-Related diseases**, in: Rattan, S., Kassem, M. (Orgs.). *Prevention and Treatment of Age-related Diseases*. Springer, Dordrecht, Denmark, p. 1–13. https://doi.org/10.1007/1-4020-5058-5_1
- Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Feng, L., Selvaraj, G., Datla, R., 2011. Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155, 1367–1382. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169045>
- Slack, C., Alic, N., Foley, A., Cabecinha, M., Hoddinott, M.P., Partridge, L., 2015. The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. *Cell.* 162, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.023>
- Swier, P.B., Mishra, H., Lohia, R., Saran, S., 2016. Overexpression of TOR (target of rapamycin) inhibits cell proliferation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Basic Microbiol.* 56, 510–519. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500313>
- Swinnen, E., Ghillebert, R., Wilms, T., Winderickx, J., 2014. Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 17–32. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12097>
- Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D., 2003. **Oxidative stress responses in yeast**, in: Hohmann, S., Mager, P.W.H. (Orgs.), *Yeast Stress*

Responses. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 241–303. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_6

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N., Loewith, R., 2007. Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell.** 26, 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.020>

Wang-michelitsch, J., Michelitsch, T.M., 2015. **Potential of longevity**: hidden in structural complexity 1–17.

Wierman, M.B., Smith, J.S., 2014. Yeast sirtuins and the regulation of aging. **FEMS Yeast Res.** 14, 73–88. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12115>

Zadąg-Tęcza, R., Maślanka, R., Bednarska, S., Kwolek-Mirek, M., 2018. **Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects**, in: Skoneczny, M. *Stress Response Mechanisms in Fungi*. Springer International Publishing, Poland, p. 1–34. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00683-9>

6 CAPÍTULO 2

Este capítulo se refere ao segundo artigo que deverá ser submetido para publicação em revista de biotecnologia, resultante da pesquisa desta tese de doutorado.

**FUNCIONAMENTO MITOCONDRIAL AFETA A REGULAÇÃO DE GENES
RELACIONADOS COM O ENVELHECIMENTO EM *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* SUBMETIDA À ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

FUNCIONAMENTO MITOCONDRIAL AFETA A REGULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM O ENVELHECIMENTO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMETIDA À ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é um organismo modelo bem aceito em estudos sobre envelhecimento, pois grande parte das funções bioquímicas, moleculares e de funcionalidade de organelas estão preservadas, permitindo estudos em curto prazo. A mitocôndria é reconhecida como uma organela-chave envolvida com o envelhecimento. Os mecanismos de resposta ao estresse estão relacionados a atividade mitocondrial, pois esta organela é a principal fonte geradora de ROS que são moléculas altamente reativas, capazes de causar danos a outras moléculas e estruturas celulares. Por esta razão, disfunções mitocondriais têm sido associadas com diversas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer, alguns transtornos mentais e ao envelhecimento. A HHP é uma ferramenta biotecnológica que induz estresse oxidativo em leveduras e provoca alterações na regulação de genes e de vias metabólicas de resposta ao estresse. Um prévio tratamento brando de HHP aumenta a tolerância ao estresse severo, porém a defesa antioxidante induzida pelo estresse não é o principal mecanismo de defesa, mas sim a tendência de células maduras em reprimir genes envolvidos com o envelhecimento. Muitos trabalhos mostram que vias de genes envolvidos com o envelhecimento como TOR1, RAS2 e SCH9 regulam o funcionamento das mitocôndrias. Entretanto, consideramos possível que a mitocôndria também influencie a regulação destes genes. Para tanto, células maduras e jovens de *S. cerevisiae* receberam um pré-tratamento com ácido protocatecuico (PCA), para a proteção mitocondrial contra o estresse severo de HHP. Assim, foi analisado a tolerância ao estresse através do crescimento de u.f.c em meio de cultura sólido. Células mães tiveram a parede celular marcada com Calcoflúor White e se dividiram para a formação de uma geração de células filhas sem marcação para análise do acúmulo de ROS e do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo. Mitotracker Green-FM foi utilizado para a análise de alterações morfológicas de mitocôndrias por microscopia de fluorescência. A expressão relativa de genes envolvidos com envelhecimento e defesas antioxidantes foram realizados por PCR em tempo real na população total de leveduras. A proteção das mitocôndrias favoreceu a tolerância das

leveduras ao estresse severo de HHP, impediu o acúmulo de ROS, indicativamente reduziu o $\Delta\Psi_m$ sem acionar os mecanismos de apoptose, e reprimiu genes envolvidos com o envelhecimento. Os genes antioxidantes CTT1 e SOD2 também foram reprimidos, porém a atividade antioxidante do PCA supriu a falta dos antioxidantes. Assim, mostramos que as mitocôndrias influenciam a regulação de genes envolvidos com o envelhecimento e não somente estes genes influenciam o funcionamento das mitocôndrias.

Palavra-chaves: leveduras, tolerância ao estresse, células maduras, células jovens, mitocôndrias, envelhecimento.

MITOCHONDRIAL FUNCTIONING AFFECTS REGULATION OF GENES RELATED TO AGING IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUBMITTED TO HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is a model organism well accepted in aging studies, since most of the biochemical, molecular and organelle functionality are preserved, allowing analysis important in shorter time. Mitochondria are recognized as a key-organelle involved with aging. The stress response mechanisms are related to mitochondrial activity, as this organelle is the main ROS source, which are highly reactive molecules capable of damaging other molecules and cellular structures. For this reason, mitochondrial dysfunctions have been associated with various neurodegenerative and cardiovascular diseases, cancer, some mental disorders and aging. HHP is a biotechnological tool that induces oxidative stress in yeast and causes changes in genes regulation and stress response metabolic pathways. Previous mild HHP treatment increases severe stress tolerance, however stress-induced antioxidant defense is not the primary defense mechanism, but rather the tendency of mature cells to down-regulate genes involved with aging. Many studies show that aging genes pathways such as TOR1, RAS2 and SCH9 regulate the mitochondria functionality. However, we consider it possible that mitochondria also influence the regulation of these genes. For this, mature and young *S. cerevisiae* cells were pretreated with protocatechuic acid (PCA) for mitochondrial protection against severe HHP stress. Thus, stress tolerance through u.f.c growth in solid culture medium was analyzed. Mother cells had the Calcofluor White labeled cell wall and they divided to form a unlabeled daughter cells generation for analyse of ROS and $\Delta\Psi_m$ by flow cytometry. Mitotracker Green-FM was used for the mitochondria morphological changes analysis by fluorescence microscopy. Genes relative expression involved with aging and antioxidant defenses were performed by real time PCR in yeast general population. Mitochondria protection favored the yeast tolerance to HHP severe stress, prevented ROS accumulation, indicatively reduced $\Delta\Psi_m$ without triggering apoptosis mechanisms and down-regulated genes involved with aging. CTT1 and SOD2 antioxidant genes were also down-regulated, however the PCA antioxidant activity supplied the lack of antioxidants. Thus, we show that mitochondria influence the genes

regulation involved with aging and not only these genes influence the mitochondria functionality.

Keywords: yeast, stress tolerance, mature cells, young cells, mitochondria, aging.

6.1 INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é um fungo ou levedura muito utilizado como modelo para estudos relacionados ao envelhecimento, regulação de expressão gênica, transduções de sinais, ciclo celular, metabolismo, apoptose, desordens neurodegenerativas, dentre outros processos biológicos (KARATHIA et al., 2011). Estas leveduras são anaeróbias facultativas capazes de suprir suas necessidades energéticas consumindo o ATP gerado pela fermentação alcoólica. Entretanto, técnicas de silenciamento ou deleção gênica permite a geração de mutantes viáveis para a realização de estudos mitocondriais (ALTMANN; DÜRR; WESTERMANN, 2007).

A *S. cerevisiae* também é útil para compreender mecanismos de resposta ao estresse, os quais estão intimamente conectados às vias de longevidade e envelhecimento (LIPPUNER; JULOU; BARRAL, 2014). A teoria do envelhecimento baseada no acúmulo de danos decorrentes do estresse oxidativo retrata bem a conexão entre estas vias (CHEN et al., 2017; HÖHN et al., 2017). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos normais do metabolismo celular e em baixos níveis induz a produção de moléculas protetoras contra o estresse. No entanto, o desbalanço entre uma produção excessiva de ROS e quantidade insuficiente de enzimas antioxidantes ocasionam danos a moléculas importantes, favorecendo o envelhecimento (ZADRAĞ-TECZA et al., 2018).

A HHP é uma ferramenta capaz de induzir estresse oxidativo em leveduras, provocando um aumento da produção de ROS e da regulação de genes antioxidantes (AERTSEN et al., 2005; BRAVIM, Fernanda et al., 2016). Dentre as alterações fenotípicas provocadas pelo aumento da pressão, estão a compactação do volume celular, redução da fluidez das membranas, polimerização e desnaturação de proteínas, interrupção do processo de divisão celular para induzir vias de sinalização envolvidas na resposta ao estresse, dentre outros (FERNANDES, P.M.B., 2005). O piezotratamento de 50 megapascal (MPa) é considerado um estresse brando para as leveduras, capaz de induzir resistência a um posterior estresse severo a partir de 100 MPa. Entretanto, esta resistência só é alcançada após permitir às células um período de 15 min de recuperação em pressão ambiente, antes do tratamento severo de HHP (PALHANO et al., 2004).

As mitocôndrias são as principais geradoras de ROS intracelular e têm sido consideradas organela-chaves do envelhecimento. Evidências mostram que o declínio da função mitocondrial está associado ao envelhecimento (SUN; YOULE; FINKEL, 2016). Sendo assim, estratégias para melhorar a qualidade mitocondrial podem promover longevidade saudável. Com vistas ao envolvimento das mitocôndrias nos mecanismos de resposta ao estresse e sua relação com o processo de envelhecimento, este trabalho buscou proteger as mitocôndrias de *S. cerevisiae* mediante estresse severo de HHP, a fim de avaliar a influência desta organela sobre a regulação de genes envolvidos com o envelhecimento.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 CEPAS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas neste estudo, a tipo selvagem S288C e a mutante UCC5181 *Mat@ade::hisG leu2 met15D::ADE2 trp1D63 ura3D0 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2-loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX*. A cepa UCC5181 resulta de uma modificação genética de sua parental S288C, como descrito em (Lindstrom and Gottschling, 2009), que gentilmente nos doaram para este estudo. A modificação genética permite a esterilidade das células filhas em meio de cultura contendo β -estradiol sem afetar a replicação das células mães.

As células cresceram em meio YEPD líquido (1% yeast extract, 2% peptone, 2% de glucose), mediante aeração e aquecimento de 30°C até a fase exponencial de aproximadamente 6×10^6 cel. /mL. O meio sólido foi suplementado com 2% de ágar. As células foram centrifugadas e reinoculadas em novo meio YEPD. Aguardou-se o crescimento de uma geração de células filhas até aproximadamente $1,0 \times 10^7$ cel. /mL.

Para confirmar que a cepa mutante UCC5181 não herdou da sua parental S288C uma mutação do gene HAP1, que torna a cepa inadequada para estudos mitocondriais, foram realizados testes utilizando acetato de sódio como fonte de carbono, que mostrou que UCC5181 possui funcionalidade mitocondrial normal, sendo adequada para tal estudo.

6.2.2 CONDIÇÕES DE ESTRESSE

A HHP foi aplicada utilizando um equipamento previamente descrito (BRAVIM, F et al., 2010). A suspensão de células foi colocada dentro de um tubo de Teflon, sem bolhas de ar, em temperatura ambiente. A HHP foi aplicada sobre um pistão cilíndrico e medido com um manômetro mecânico calibrado. As células de leveduras foram submetidas aos seguintes tratamentos:

[a] 50 MPa por 30 min, seguido por 15 min de recuperação em agitação e pressão ambiente ou 0,1 MPa, seguido por 100 MPa por 30 min;

[b] PCA [$3,12 \times 10^{-2}$ mg/mL], equivalente a aproximadamente [$200 \mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min, seguido por 100 MPa por 30 min.

Ao fim dos tratamentos, foram feitas diluições seriadas e as células foram repicadas em placas de petri com meio YEPD sólido para a análise de sobrevivência da população geral ao estresse de HHP, através da formação de u.f.c.

6.2.3 PCR EM TEMPO REAL

O RNA total das células de leveduras foi extraído utilizando fenol/clorofórmio e precipitado com acetato de sódio 3 mol.L^{-1} e etanol absoluto como previamente descrito por (PALHANO et al., 2004). As amostras foram tratadas por 30 min com 1,0 U de DNase I livre de RNase / μg RNA. O cDNA foi sintetizado usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, LT, USA). As reações foram realizadas com Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Software download v. 2.0.6, Applied Biosystems, USA). A curva de calibração e os níveis de expressão relativa (RQ) foram realizados como descrito em (BRAVIM, Fernanda et al., 2013). Para cada gene foi obtida uma curva de calibração com diluições seriadas para determinar a eficiência da amplificação. RQs foram obtidas através do cálculo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, no qual $\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct tratamento} - \Delta\text{Ct controle})$ em \log_2 , com aplicação do critério de FDR para o controle de resultados falsos positivos. Os dados adquiridos foram normalizados para os níveis de expressão do gene endógeno ALG9. Os oligonucleotídeos utilizados como primers nas reações de qRT-PCR foram desenhados com o auxílio do *Primer Express 3.0* (taq@MGB quantification), *Primer 3 Plus* e o banco de informações genômicas de *Saccharomyces cerevisiae Genome data base*. Os primers utilizados para a amplificação estão listados na tabela 1 deste capítulo.

Gene	Sequência do primer	Tamanho do amplicon (pb)	Eficiência
<i>TOR1</i>	Direção 5'-3': AGATGCTGGGGTCGCAAAA	100	101
	Direção 3'-5': AGCATGGGAGGGTGA CTCT		
<i>RAS2</i>	Direção 5'-3': TCCAGCCATGCAAGCAAAG	65	91
	Direção 3'-5': 5':TCCCGGGATAAAGGAACCA		
<i>SCH9</i>	Direção 5'-3': TCCAGCCATGCAAGCAAAG	129	104
	Direção 3'-5': TCCCGGGATAAAGGAACCA		
<i>CTT1</i>	Direção 5'-3': ACGGCCCTATCTTACTGAA	79	95
	Direção 3'-5': TACACGCTCCGGA ACTCTTT		
<i>SOD2</i>	Direção 5'-3': AACCAGGATACCGTCACAGG	130	95
	Direção 3'-5': TTCCAGTTGACCACATTCCA		
<i>ALG9*</i>	Direção 5'-3': ACATCGTCGCCCAATAAAT	145	96
	Direção 3'-5': GATTGGCTCCGGTACGTAAA		

*Gene de referência

Table 1: Oligonucleotídeos usados como primers por PCR em tempo real.

6.2.4 MARCADORES FLUORESCENTES

6.2.4.1 Acúmulo de ROS

A análise do acúmulo de ROS em células mães e filhas foi realizado por citometria de fluxo, usando as sondas fluorescentes CM-H2DCFDA (Sigma, MO, USA). CM-H2DCFDA é um indicador de estresse oxidativo. O fluoróforo se difunde para o interior das células, onde se localizam os grupos acetatos, sendo clivado pelas estearases intracelulares e, o grupo tiol formado reage com glutatona intracelulares e outros oxidantes contendo grupos tiol. As leituras foram realizadas através dos equipamentos Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Para distinguir acuradamente as células mães e filhas e realizar as análises por citometria de fluxo foi utilizado o corante Calcofluor White Stain (Fluka Analytical, MO, USA), o qual adere à quitina da parede celular, permitindo identificar as células mães que ao se dividirem não transmite para as células filhas a impregnação do corante. Assim, o inóculo foi preparado nas mesmas condições descritas no item 6.2.1. Após centrifugar o inóculo, lavar com PBS, Calcofluor White foi adicionado brevemente. As células foram novamente lavadas com PBS por 2 vezes, reinoculadas no novo meio de cultura e aguardou-se a replicação de uma geração de células filhas.

Testes foram realizados e o Calcofluor White mostrou não interferir nas condições dos tratamentos aplicados e nem na emissão da fluorescência do CM-H2DCFDA. Como controle positivo para a detecção de ROS foi utilizado estresse com H₂O₂ [15 mmol.L⁻¹] por 60 min.

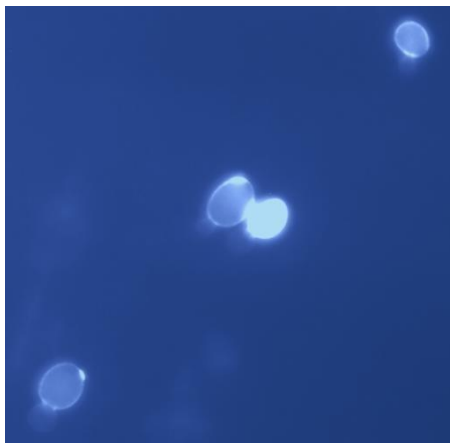


Imagem 1: Diferenciação de células mães e filhas por fluorescência com Calcoflúor White. Imagem de microscopia de fluorescência mostrando a diferenciação de células mães e filhas com o corante Calcofluor White para análises de produção de ROS e $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo. As células mães apresentam fluorescência mais intensa. Células pequenas e com baixa fluorescência nasceram sem impregnação do corante em sua parede celular. A imagem corresponde a uma representação de três experimentos.

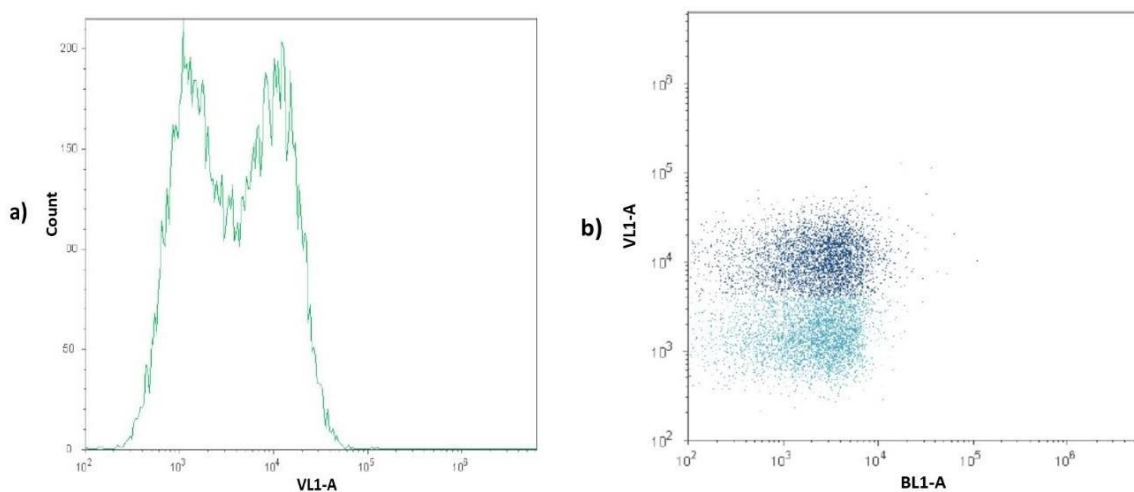


Figura 1: Identificação de células mães e filhas por citometria de fluxo. Figura representativa da identificação e células mães e filhas por citometria de fluxo para as análises de produção de ROS e $\Delta\Psi_m$. As figuras mostram como as populações de células foram setadas para as análises. a) histograma mostrando a diferença entre células mães e filhas por complexidade (primeiro pico - células filhas sem calcoflúor; segundo pico - células mães impregnadas com calcoflúor). b) plotagem mostrando duas populações (plotagem azul escuro – células mães coradas com calcofluor; plotagem azul claro – células filhas sem calcofluor). O canal VL1-A, permite distinguir pela complexidade e o canal BL1-A, permite distinguir o deslocamento lateral das células para a análise da intensidade de fluorescência emitida pelos corantes para detecção de ROS e $\Delta\Psi_m$. A figura corresponde a uma representação de três experimentos.

6.2.4.2 Indicador de variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A indicação da variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células mães e filhas foi realizado por citometria de fluxo utilizando a mesma metodologia para a quantificação de ROS, descrito no item 6.2.4.1. Para verificar o $\Delta\Psi_m$ foi utilizado a sonda JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Kit (Sigma, MO, USA). JC-10 é um indicador de $\Delta\Psi_m$ e apoptose. Por ser um fluoróforo catiônico e lipofílico, o JC-10 pode ser atraído pela eletronegatividade das mitocôndrias. Em células normais, JC-10 se concentra na matriz mitocondrial, formando agregados vermelho-fluorescente, detectável a partir de 595 nm. Em células apoptóticas e necróticas, JC-10 se difunde para fora das mitocôndrias em forma monomérica, emitindo fluorescência verde, detectável a partir de 520 nm. Tais mudanças entre a forma agregada e monomérica indicam o estado de polarização da membrana mitocondrial. Para a visualização das células coradas com JC-10 foi utilizado microscopia de fluorescência eletrônica, utilizando o microscópio NIKON ECLIPSE Ti (DS-Qi1Mc) e o programa NIS-Elements AR. O controle negativo foram células não coradas e o controle positivo das amostras foram células tratadas com estresse térmico em banho quente a 50°C por 30 min (Fig. 3). A figura 3 demonstra como as populações foram plotadas para análises por citometria de fluxo.

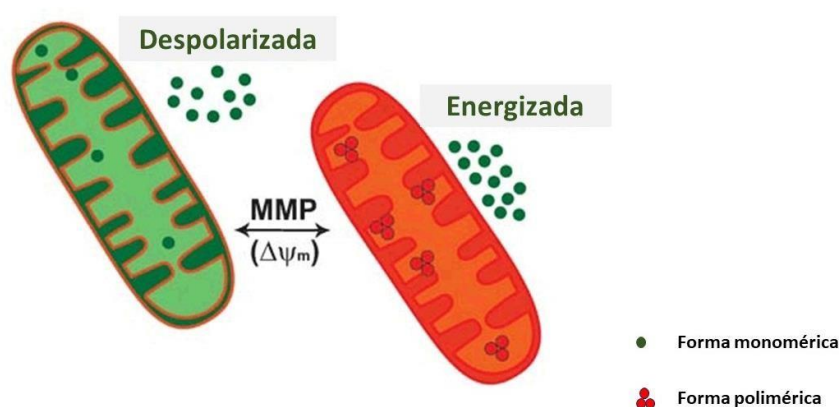


Figura 2: Representação de mitocôndrias despolarizadas e energizadas. Representação da atuação do fluoróforo JC-10 em suas formas monomérica e polimérica para o indicativo do $\Delta\Psi_m$. Em mitocôndrias pouco energizadas ou despolarizadas o fluoróforo catiônico se apresenta em forma monomérica, emitindo fluorescência verde. Mitocôndrias muito energizadas ou hiperpolarizadas, retêm maiores quantidades do fluoróforo catiônico formando agregados (polímeros) em seu interior, emitindo fluorescência vermelha. Fonte: adaptado de Enzo life Science (2019).

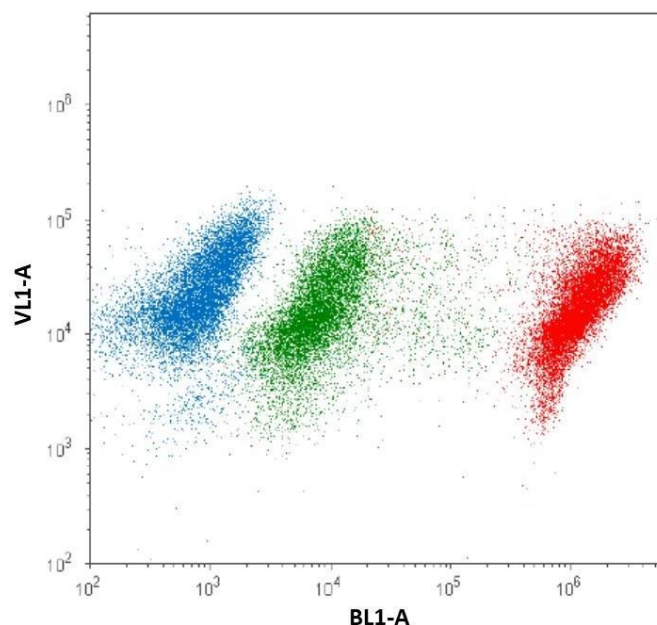


Figura 3: Representação do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo. A plotagem em azul representa o controle negativo (células não coradas); plotagem verde representa o controle corado (células em estado de repouso ou polarizadas); plotagem em vermelho representa o controle positivo com células energizadas ou hiperpolarizadas (células tratadas com estresse térmico de 50°C por 30 min). A figura corresponde a uma representação de três experimentos.

6.2.5 ANÁLISE DA DINÂMICA MITOCONDRIAL

Para visualizar a localização, morfologia e massa mitocondrial foi utilizado a sonda MitoTracker™ Green FM (Invitrogen, USA). Para se difundir passivamente pelas mitocôndrias, as células foram incubadas em meio contendo soro bovino fetal pré-aquecido a 37°C, adicionado do MitoTracker™ Green FM na concentração de [400 nmol.L⁻¹] por 30 min. As amostras foram então lavadas em PBS por 3 vezes, levadas à lâmina para visualização por microscopia de fluorescência, utilizando o filtro GFP. A fluorescência verde é emitida em comprimentos de ondas abaixo de 516 nm e a morfologia das mitocôndrias foram visualizadas em formatos fusionados ou fragmentadas.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 TOLERÂNCIA DE *S. CEREVISIAE* COM PROTEÇÃO MITOCONDRIAL AO ESTRESSE DE HHP

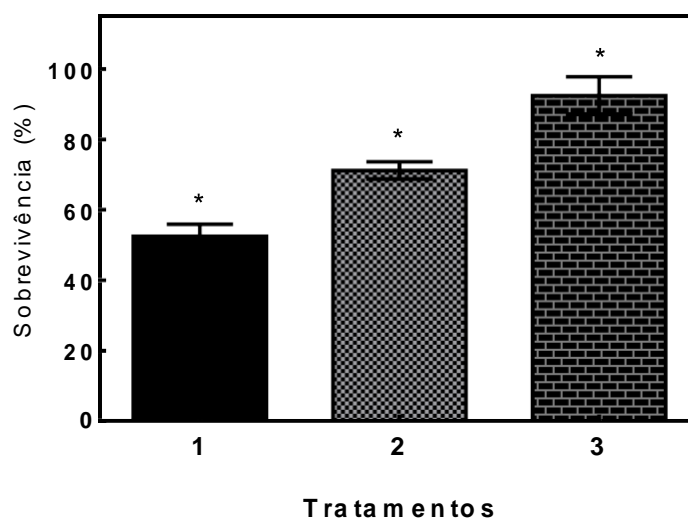


Figura 4: Tolerância de *S. cerevisiae* UCC5181 ao estresse de HHP. (1) células submetidas à 100 MPa por 30 min foram o controle; (2) células submetidas à 50 MPa por 30 min, seguido por 15 min em pressão ambiente (0,1 MPa) e aeração, seguido por 100 MPa por 30 min; (3) células pré-tratadas com PCA [200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min, submetidas à 100 MPa. Observa-se que 51% das células toleram o estresse de 100 MPa por 30 min, o pré-tratamento com 50 MPa por 30 min, seguido pelo tempo de recuperação eleva essa tolerância para 71% e, células pré-tratadas com PCA antes de 100 MPa alcançam 92% de tolerância. As análises foram realizadas calculando a porcentagem de u.f.c em meio de cultura sólido, após diluições seriadas apropriadas. Os experimentos foram realizados em três triplicatas independentes. As barras de erro indicam o SD das medidas. A estatística foi analisada utilizando o método Ordinary one-way ANOVA (* $p < 0,05$) dos tratamentos entre si.

Testes de sobrevivência foram realizados com a cepa UCC5181 de *S. cerevisiae*, utilizando diretamente o estresse severo de 100 MPa por 30 min; 50 MPa por 30 min, seguido por 15 min em pressão ambiente (0,1 MPa) e aeração, seguido por 100 MPa por 30 min; e PCA [200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min, seguido por 100 MPa por 30 min. A figura 4 nos mostra que com o estresse de 100 MPa houve uma sobrevivência ou tolerância de cerca de 51% da população. Quando as células foram pré-tratadas com 50 MPa, seguido por 15 min de recuperação antes do tratamento de

100 MPa, esta sobrevivência aumentou para uma média de 71%. No entanto, células com proteção mitocondrial (PM) mostraram um aumento da sobrevivência para cerca de 92%.

O aumento da tolerância ao estresse refletido pela taxa de sobrevivência da cepa UCC5181 pré-tratada com estresse brando de 50 MPa com aclimação antes do estresse severo de 100 MPa (Fig. 4), corrobora com trabalhos anteriores que mostraram que este método favorece uma melhor resposta ao estresse severo posteriormente aplicado (PALHANO et al., 2004). No entanto, a PM favoreceu um aumento ainda mais significativo da sobrevivência dessas células. Sendo assim, a PM mostrou ser de grande importância para a resistência a um estresse severo como a HHP.

O artigo descrito no capítulo 1 mostra que a maturidade celular é extremamente importante para a resistência de UCC5181 de *S. cerevisiae* ao estresse de HHP (Fig. 1, cap.1). As células mães ou maduras (aquelas que geraram pelo menos uma descendente) se mostraram quase três vezes mais tolerantes a HHP que as células filhas ou jovens (aquelas que ainda não geraram descendentes). Tendo em vista que a PM ocasionou uma elevação de 71% para 92% na tolerância das células submetidas a HHP (Fig. 4), podemos concluir que a PM favoreceu as células que antes não resistiam a tratamento severo de HHP, dentre as quais podemos inferir as células filhas, as quais resistiam pouco ao tratamento apenas com HHP (Fig. 1, cap. 1). Haja visto que, no comparativo entre os tratamentos mostrados na figura 4, apenas 8% de toda população com PM não resistiram ao estresse de 100 MPa.

6.3.2 ACÚMULO DE ROS EM *S. CEREBISIAE* SUBMETIDA A HHP

Foram realizados experimentos com a cepa UCC5181 de *S. cerevisiae* para avaliar o acúmulo de ROS após o estresse severo de 100 MPa por 30 min em células pré-tratadas com 50 MPa por 30 min mais aclimação e células que receberam a PM com PCA. Partindo dos resultados de sobrevivência ilustrados na figura 4, o qual mostrou que células com PM resistem mais ao estresse severo que células pré-tratadas com estresse brando de HHP e, considerando a conhecida ação antioxidante do PCA, o intuito foi observar se haveria redução significativa de acúmulo de ROS após o estresse severo de 100 MPa por 30 min em células com PM.

6.3.2.1 Produção de ROS em *S. cerevisiae* submetidas à HHP

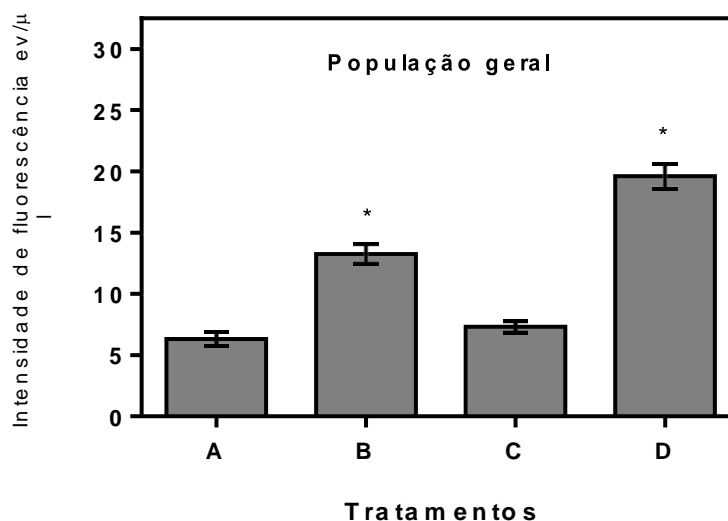


Figura 5: Produção de ROS em *S. cerevisiae* UCC5181 submetidas à HHP. As células foram coradas com 2,7-diclorofluorescente (DCF-DA) para detecção de ROS. (A) células sem tratamento foram o controle; (B) células submetidas à 50 MPa por 30 min; (C) células submetidas à 50 MPa por 30 min, seguido por pressão ambiente (0,1 MPa) e aeração por 15 min; (D) células submetidas à 50 MPa por 30 min, seguido por pressão ambiente (0,1 MPa) e aeração por 15 min, seguido por 100 MPa por 30 min. Observa-se acúmulo de ROS após 50 MPa por 30 min. Após 15 min as células se recuperaram e, na sequência, após 100 MPa por 30 min o acúmulo de ROS é ainda maior. O acúmulo de ROS em células maduras e jovens são apresentados na figura 3 do capítulo 1. Os experimentos foram realizados em três duplicatas independentes. As barras de erro representam o SD da triplicata. A estatística foi analisada utilizando o método Fisher's LSD one-way ANOVA (* $p < 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle.

Como podemos observar na figura 5, a população geral das leveduras UCC5181 acumularam ROS após o estresse brando de 50 MPa por 30 min com redução desses níveis após o tempo de recuperação. Tal resultado foi semelhante a uma pesquisa realizada utilizando cepa de destilaria, o qual atribuiu este acúmulo ao estresse oxidativo induzido pela HHP e, a redução após 15 min de recuperação, foi atribuída à codificação de enzimas antioxidantes como catalase 1, superóxido dismutase 2 e metionina S-sulfóxido redutase 1 e 2 (BRAVIM, Fernanda et al., 2016). No entanto, o consecutivo tratamento com 100 MPa por 30 min aumentou cerca de três vezes o acúmulo de ROS em relação as células sem tratamento (Fig. 5).

Análises de sobrevivência, acúmulo de ROS e regulação de genes antioxidantes em células maduras e jovens de UCC5181 submetidas ao mesmo tratamento de HHP, apresentados na figura 3 (cap.1), mostrou que as células maduras acumulam níveis bem mais elevados de ROS que as células jovens, apresentam tendência à inibição de genes antioxidantes, mas sobrevivem quase três vezes mais que as células jovens ao fim do tratamento.

Tal resultado foi atribuído ao diferente perfil de regulação de genes relacionados ao envelhecimento, dos quais as células mães mostraram tendência a uma regulação benéfica destes genes, enquanto a células filhas mostraram regulações em padrões prejudiciais, interferindo no direcionamento dos mecanismos de defesa (ver conclusões em cap.1, pag. 54). Assim, concluiu-se que os antioxidantes não são os principais mecanismos de defesa para a tolerância ao estresse de HHP, apesar de sua grande importância anti-envelhecimento.

6.3.2.2 Produção de ROS em *S. cerevisiae* com proteção mitocondrial submetida à HHP

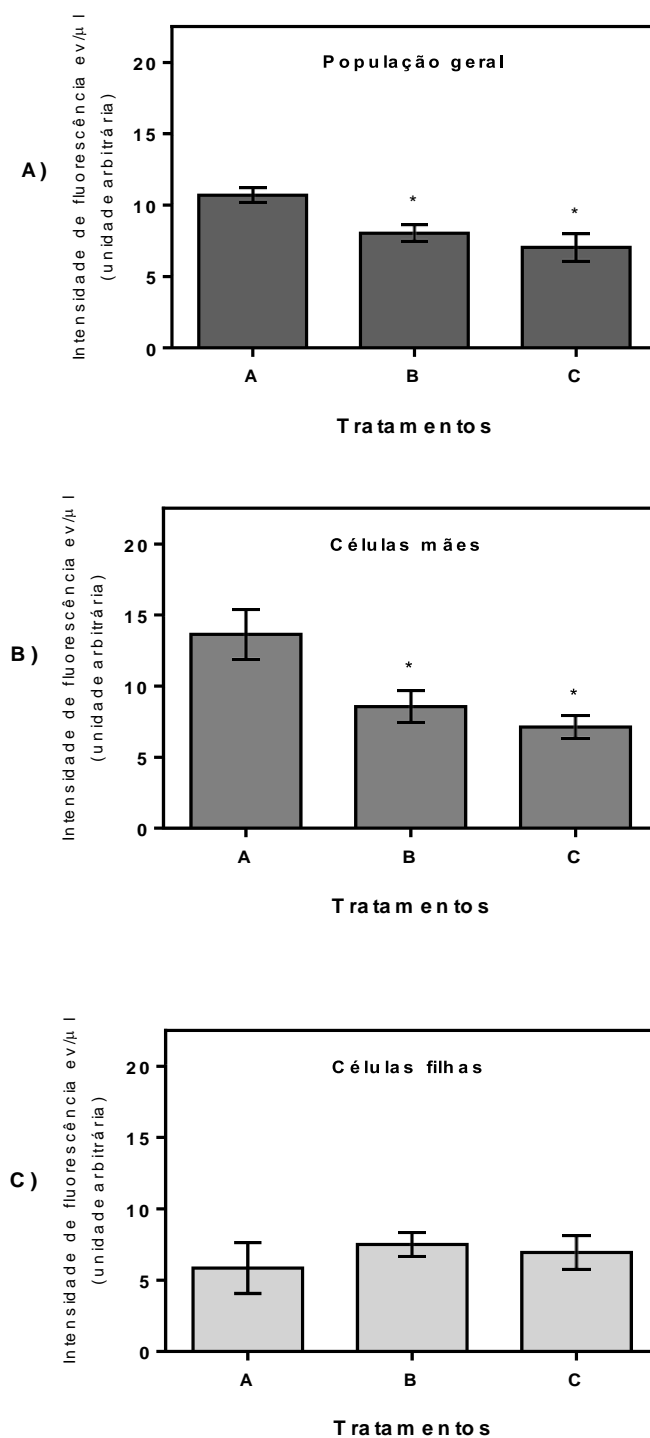


Figura 6: Produção de ROS em *S. cerevisiae* UCC5181 submetidas à HHP após proteção mitocondrial. (A) células sem tratamento; (B) células após PCA [200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min; (C) células após PCA [200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min, seguido por 100 MPa por 30 min. Observa-se que a PM com PCA levou a uma significativa redução do acúmulo de ROS após 100 MPa por 30 min em população geral de células maduras. Os níveis de ROS se mantiveram sem alterações significativas em células jovens. Os experimentos foram realizados em três duplicatas independentes. As barras de erro representam o SD da triplicata. A estatística foi analisada utilizando o método Fisher's LSD one-way ANOVA (* $p < 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle.

Nesta fase, foi realizado um pré-tratamento com PCA [$200 \mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min na mutante UCC5181 de *S. cerevisiae* para a PM antes do estresse severo de 100 MPa por 30 min, para análise do acúmulo de ROS em população total, células maduras e jovens. Sabe-se que o PCA é um composto fenólico capaz de neutralizar radicais livres, evitando danos a estruturas celulares importantes, sendo também capaz de evitar apoptose por disfunções mitocondriais, por impedir o aumento do $\Delta\Psi_m$ (LIU et al., 2008a; SON et al., 2018). A cepa UCC5181 com PM mostrou importantes resultados na tolerância ao estresse (Fig. 4) e acúmulo de ROS (Fig. 5). Como podemos observar, as células com PM toleraram bem melhor o estresse de 100 MPa que as células que receberam o pré-tratamento de 50 MPa com aclimação (Fig. 4). Além da maior tolerância, elas apresentaram redução do acúmulo de ROS (Fig. 6), que foi um problema observado nas células que resistiram ao estresse apenas com HHP (Fig. 3, cap.1 e Fig. 5).

Devido a conhecida atividade antioxidante do PCA, esperava-se uma redução do acúmulo de ROS nas células com PM. Entretanto, surpreendentemente este acúmulo foi inferior ao observado nas células antes de receberem qualquer tratamento. Nota-se também que as células maduras com PM apresentam redução do acúmulo de ROS nas consecutivas etapas do tratamento (Fig. 6B), enquanto as células jovens mantiveram esse acúmulo estável (Fig. 6C). As células maduras, naturalmente apresentam um acúmulo inicial de ROS mais elevado que as células jovens. Algumas razões para isso são que: células mais velhas apresentam mitocôndrias em maior tamanho e quantidade (STAB et al., 2016) e, conseqüentemente produzem mais ROS; além disso, estas células já enfrentaram estresses como alterações de temperatura, concentração de glicose e etanol, mudanças de pH durante o processo natural de crescimento (BRAVIM, Fernanda et al., 2010).

Diante dos resultados das células com PM, mostramos que as mitocôndrias estão envolvidas no processo de tolerância ao estresse. Células que não sofrem aumento do $\Delta\Psi_m$ mantêm sua qualidade, produzem menos ROS e toleram melhor o estresse, conforme a hipótese inicialmente levantada. Juntamente a ação antioxidante do PCA, a redução do acúmulo de ROS ao fim do tratamento foi importante para impedir a progressão do envelhecimento. Mostramos também que a intervenção

adotada beneficiou quase todas as células, alcançando um dos objetivos proposto neste estudo, dentre as quais estão células mães e filhas.

6.3.3 Indicativo de $\Delta\Psi_m$

6.3.3.1 Indicativo de $\Delta\Psi_m$ em *S. cerevisiae* submetida à HHP

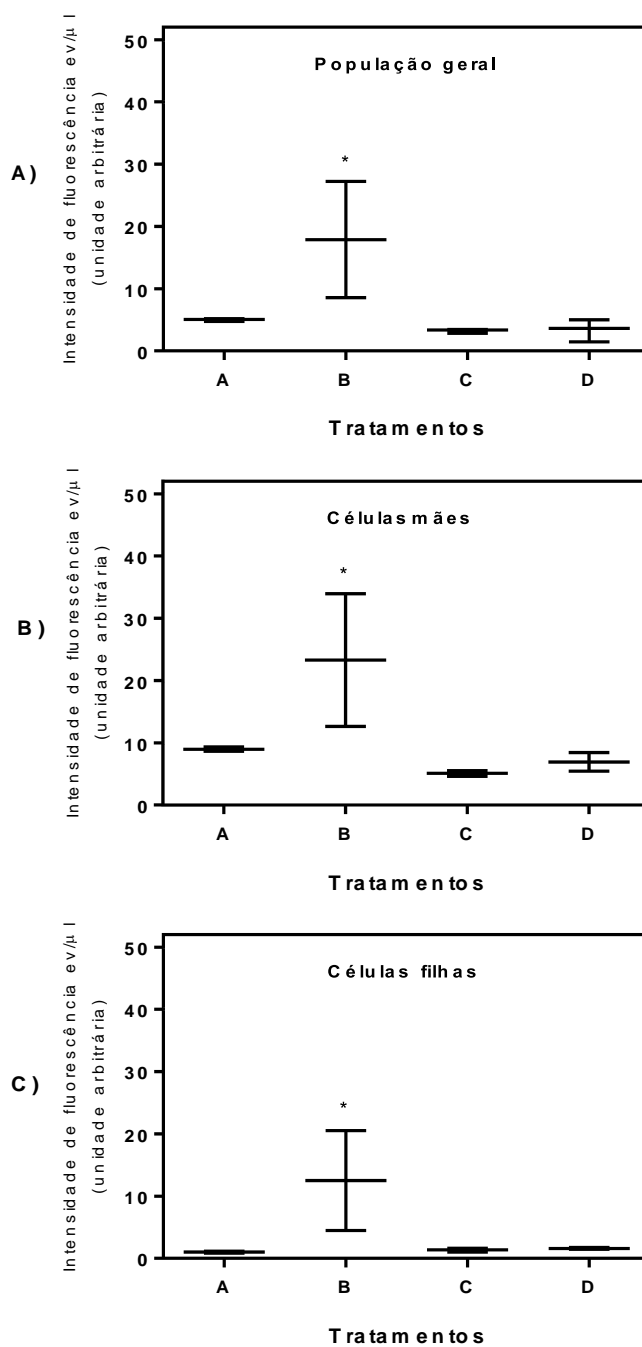


Figura 7: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em *S. cerevisiae* UCC5181 submetidas à HHP. As células foram coradas com o fluoróforo catiônico JC-10 para análise do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo. (A) células sem tratamento foram o controle; (B) células submetidas à 50 MPa por 30 min; (C) células submetidas à 50 MPa por 30 min, seguido por 0,1 MPa por 15 min; (D) células submetidas à 50 MPa por 30 min, seguido por 0,1 MPa por 15 min, seguido por 100 MPa por 30 min. Observa-se significativo aumento da fluorescência celular após o pré-tratamento de 50 MPa por 30 min e redução após o período de recuperação e após o consecutivo estresse de 100 MPa em população geral, células maduras e jovens. Os experimentos foram realizados em três triplicatas independentes. As barras de erro representam o SD das triplicatas. A estatística foi analisada utilizando o método Fisher's LSD one-way ANOVA (* $p < 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle.

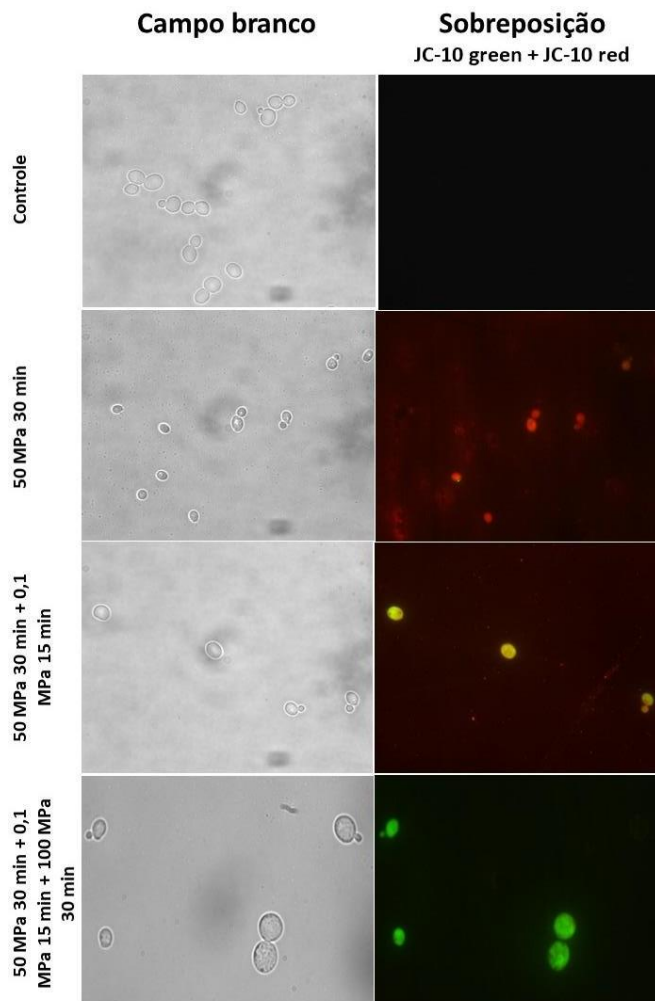


Imagem 2: Imagem de microscopia de fluorescência de *S. cerevisiae* UCC5181 submetida à HHP. As células foram coradas com o fluoróforo catiônico JC-10 para a análise do $\Delta\Psi_m$ por microscopia de fluorescência. As imagens à esquerda mostram as células em campo branco e à direita, imagens de JC-10 green (520 nm) e JC-10 red (595 nm) sobrepostas. Observa-se um aumento da fluorescência vermelha (indicando hiperpolarização) após 50 MPa por 30, redução dessa fluorescência após 15 min de aclimação e, aumento da fluorescência verde (indicando despolarização) após o estresse consecutivo tratamento de 100 MPa por 30 min. As imagens representam uma de três triplicatas.

A cepa UCC5181 de *S. cerevisiae* também foi submetida a análise indicativa do $\Delta\Psi_m$ mediante o estresse de HHP, pois suspeitávamos que o indicativo aumento do $\Delta\Psi_m$ observado em parte das células após o estresse de 50 MPa teria relação com a menor tolerância de algumas células ao posterior estresse de 100 MPa. Em humanos, as consequências do funcionamento anormal das mitocôndrias afeta uma rede integrada de fatores envolvidos com crescimento e mecanismos de reparo que atuam no combate ao envelhecimento, refletindo em neuro-degeneração, doenças

cardiovasculares e câncer (CAO et al., 2017). A manutenção do $\Delta\Psi_m$ em estado polarizado é essencial para manter a saúde e a viabilidade celular. Entretanto, pequenas variações podem ocorrer sem prejuízos significativos, porém mudanças sustentadas podem acarretar efeitos deletérios, levando à morte (PERRY et al., 2011; ZOROVA et al., 2018).

O estresse de 50 MPa por 30 min induziu significativo aumento de fluorescência vermelha, indicativo de aumento do $\Delta\Psi_m$ em parte das células (Fig. 7). Após 15 minutos houve proximidade ao indicativo potencial de repouso e este potencial mostrou indicativa tendência à despolarização imediatamente após 100 MPa por 30 min (Fig. 7). As imagens do $\Delta\Psi_m$ por microscopia de fluorescência (Imagem 2) confirmam os dados das análises de citometria mostrados na figura 7. De acordo com alguns autores, tanto o aumento quanto a redução do $\Delta\Psi_m$ estão relacionados ao aumento da produção de ROS e podem levar a célula à morte por apoptose (LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2010).

Pyatrikas et al. 2015, afirmam haver uma estreita relação entre aumento do $\Delta\Psi_m$ e aumento da produção de ROS, bem como a redução do $\Delta\Psi_m$ e redução da produção de ROS em *S. cerevisiae* submetidas a estresse térmico por calor. Os resultados deste estudo vão de encontro com as duas afirmações no estresse por HHP. Observamos que houve indicativo aumento do $\Delta\Psi_m$ (Fig. 7) e do acúmulo de ROS (Fig. 5) em *S. cerevisiae* após o estresse de 50 MPa, conforme ocorreu no estudo de estresse térmico (PYATRIKAS et al., 2015). Porém, este acúmulo de ROS foi ainda mais elevado com a indicativa despolarização mitocondrial provocada pelo consecutivo tratamento de 100 MPa (Fig. 7 e Imagem 2), corroborando com as afirmações que a redução do $\Delta\Psi_m$ estão relacionados à despolarização e morte apoptose (LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2010).

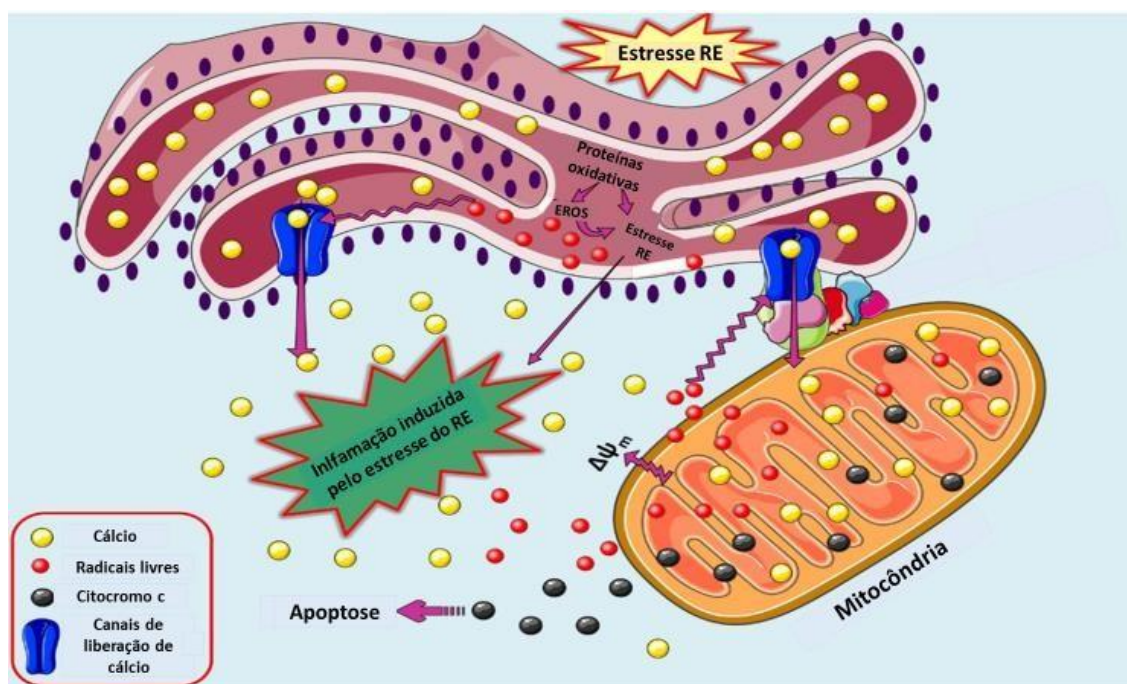


Figura 8: Figura ilustrativa da interação entre o retículo endoplasmático (RE) e a mitocôndria na ativação da cascata apoptótica. A figura ilustra o estímulo de estresse induzindo o RE a liberar íons Ca^{2+} . O Ca^{2+} influi para o interior da mitocôndria através de interações entre proteínas de membranas das duas organelas, fazendo com que as mitocôndrias despolarizem. No interior da mitocôndria, o Ca^{2+} interage com proteínas da membrana interna, liberando o Citocromo c para o citosol. No citosol, o Citocromo c ativa a cascata apoptótica (através de ligações com as capazes). Todo este processo associado ao acúmulo de ROS, culminam na morte celular por apoptose. Fonte: *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014 (adaptado).

O corante catiônico JC-10 utilizado para indicar o $\Delta\Psi_m$ é considerado um eventual indicador de apoptose (PERELMAN et al., 2012). A indicativa despolarização (Imagem 2) associada aos altos níveis de ROS (Fig. 7) sugerem que houve importante comprometimento da atividade e da qualidade das mitocôndrias e, isto pode ter levado as células submetidas a HHP à morte por apoptose. Estudos mostram que o retículo endoplasmático (RE) e as mitocôndrias interagem entre si durante o estresse (Fig. 8). Assim, o estresse induz o RE a liberar íons Ca^{2+} . O Ca^{2+} influi para o interior da mitocôndria, através de interações entre proteínas de membranas das duas organelas, fazendo com que as mitocôndrias despolarizem. No interior da membrana interna mitocondrial, o Ca^{2+} interage com proteínas que provocam alterações de conformação, permitindo a liberação do Citocromo c para o citosol. No citosol, o Citocromo c ativa a cascata apoptótica (através de ligações com as capazes). Todo

este processo associado ao acúmulo de ROS, culminam na morte celular por apoptose (NAMRATA et al., 2014).

Deste modo, a indicativa despolarização mitocondrial ocorrida após o estresse de HHP, juntamente com os altos níveis acumulados de ROS podem ter contribuído para a liberação do Citocromo c e induzido morte por apoptose destas leveduras, compatível com imagens de células indicativas de mitocôndrias despolarizadas (Imagem 2). No entanto, observamos que não são todas as células que sofrem estes extremos que indicam aumento e redução do $\Delta\Psi_m$. Existe uma parte da população que parece conseguir manter seu $\Delta\Psi_m$ sem variações perceptíveis. Por perceptivelmente conseguirem manter o $\Delta\Psi_m$ o mais próximo possível do estado polarizado, acreditamos que estas células são as que melhor resistem ao estresse.

O aumento do $\Delta\Psi_m$ tem sido associado a alguns tipos de câncer em humanos (FIALKOVA et al., 2017). Nas leveduras, parece estar relacionado com as células que toleraram menos o estresse de HHP. Diante destes fatos, o indicativo impedimento do aumento do $\Delta\Psi_m$ mediante o estresse severo de HHP foi uma hipótese levantada para melhorar a resistência das leveduras ao estresse de HHP. Nestas análises, células mães e filhas apresentaram padrão semelhante de indicativa variação do $\Delta\Psi_m$ (Fig. 11). Na variedade das imagens analisadas (não mostrado), observamos que brotos de células filhas apresentaram a tendência de acompanhar o indicativo estado de polarização da célula mãe que lhe deu origem. Possivelmente, isso se relaciona ao fato de células mães transmitirem parte de suas mitocôndrias para suas filhas durante a divisão celular (CAPELSON; HETZER, 2009).

6.3.3.2 Indicativo de $\Delta\Psi_m$ em *S. cerevisiae* com proteção mitocondrial submetida à HHP

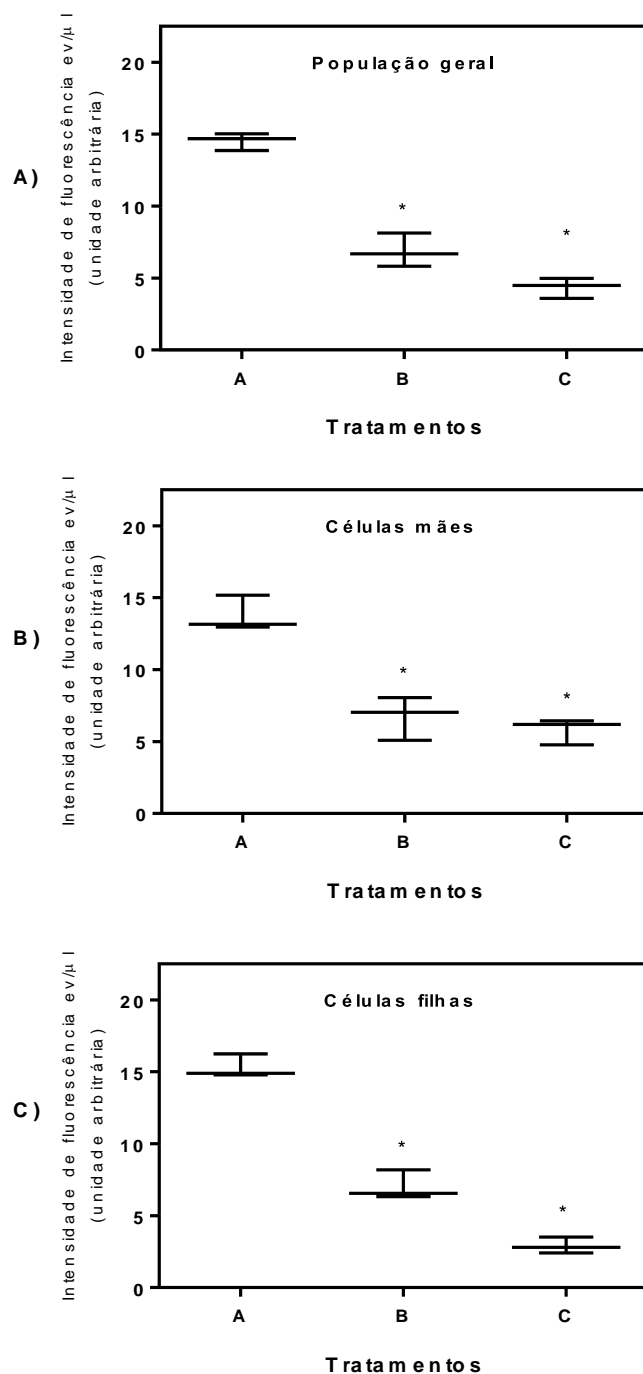


Figura 9: $\Delta\Psi_m$ em *S. cerevisiae* UCC5181 submetidas à HHP após PM com PCA. As células foram coradas com o fluoróforo catiônico JC-10 para análise da $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo. (A) células sem tratamento foram o controle; (B) células pré-tratadas com PCA [200 μ mol.L⁻¹] por 30 min; (C) células pré-tratadas com PCA [200 μ mol.L⁻¹] por 30 min, seguido por 100 MPa por 30 min. Observamos uma redução da intensidade de fluorescência (indicativo de despolarização) após a adição de PCA e do estresse de HHP na população geral e células filhas (A e C). Células mães apresentaram essa redução de intensidade de fluorescência após a adição do PCA e mantiveram este quadro após o estresse de HHP (B). Os experimentos foram realizados em três triplicatas independentes. As barras de erro representam o SD das triplicatas. A estatística foi analisada utilizando o método Fisher's LSD one-way ANOVA (* $p < 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle.

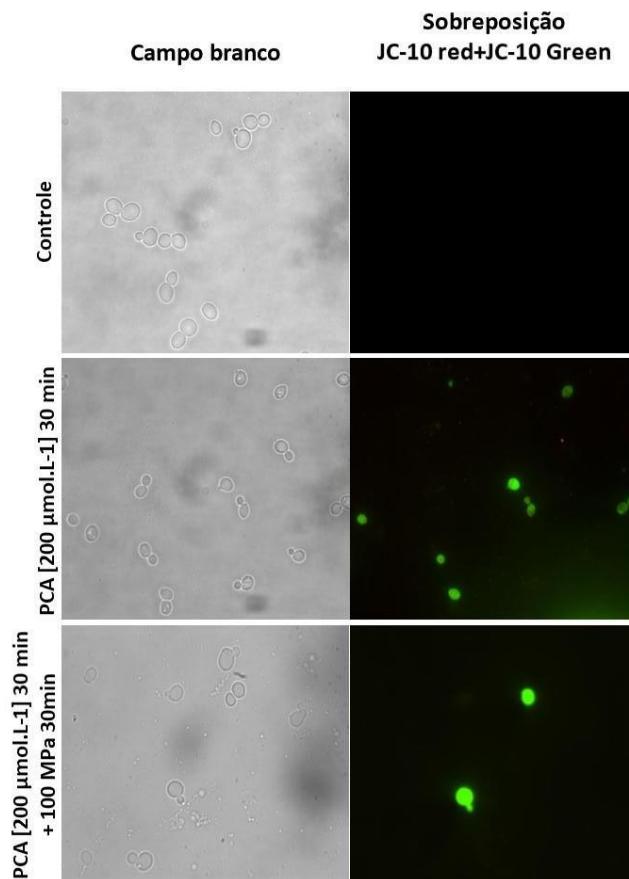


Imagem 3: Imagens de microscopia de fluorescência em *S. cerevisiae* UCC5181 submetida à HHP após PM. As imagens à esquerda mostram as células em campo branco e à direita o merged das imagens em JC-10 green (520 nm) e JC-10 red (595 nm). As imagens foram feitas em aumento de 100X. Observamos células com fluorescência verde após o pré-tratamento com PCA [200µmol.L-1] por 30 min (indicativo de despolarização) e após o estresse severo de 100 MPa por 30 min. As imagens representam uma de três triplicatas.

Neste tópico, mostramos células de UCC5181 pré-tratadas com PCA na concentração aproximada de [200 µmol.L-1] por 30 min para a PM antes do tratamento com 100 MPa por 30 min e observação indicativa do $\Delta\Psi_m$. A expectativa era que as células com PM resistiriam melhor ao estresse severo de HHP, pelo fato dessa intervenção impedir o aumento do $\Delta\Psi_m$. Também era esperado que haveria redução do acúmulo de ROS após o estresse severo devido ao potencial antioxidante do PCA. Além da ação antioxidante, o PCA também promove a saúde das mitocôndrias por evitar o aumento do $\Delta\Psi_m$ e apoptose por disfunções mitocondriais (LIU et al., 2008a).

Como podemos observar na figura 8 e na imagem 3, a PM proporcionada pelo PCA indica redução significativa do $\Delta\Psi_m$ de boa parte das células, preparando-as para o estresse severo de 100 MPa. Após à HHP, esta indicativa despolarização pareceu um pouco mais acentuada (Imagem 3). De forma semelhante ao que ocorreu na indicativa hiperpolarização induzida pelo estresse de 50 MPa por 30 min (Imagem 2), não foram todas as células que indicativamente despolarizaram, ou, não despolarizaram na mesma intensidade (Fig. 9 e Imagem 3). Observamos que as células maduras mantiveram o $\Delta\Psi_m$ em níveis parecidos após os 30 min da adição do PCA e após consecutivo 100 MPa por 30 min (Fig. 9). Entretanto, as células filhas parecem mostrar uma indicativa tendência a despolarizar um pouco mais ao fim do estresse severo (Fig. 9B). Não está claro se esta diferença acarreta alguma vantagem ou prejuízo às células jovens.

A despolarização mitocondrial está geralmente associada ao processo de apoptose. Esta associação tem sido feita pelo fato da despolarização promover a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), causando a liberação do citocromo c (apoptogênico) da membrana interna da mitocôndria para o citosol e, subsequente ativação da cascata apoptótica (LIU et al., 2008b). Porém, apoptose não foi o que ocorreu com as células neste tratamento. Afinal, houve um aumento de 51% para 92% na tolerância das leveduras com PM ao estresse de 100 MPa (Fig. 4). Conforme discussão no item 6.3.4.1, a interação entre o RE e as mitocôndrias durante o estresse leva à liberação do Citocromo c pelas mitocôndrias e ativação do processo de apoptose (NAMRATA et al., 2014). Entretanto, ao que tudo indica, o PCA em concentrações adequadas não estimula a liberação do Ca^{2+} de RE para o interior das mitocôndrias, ao contrário do que vimos na figura 8. Sem liberação de Ca^{2+} não há ativação da cascata apoptótica por via mitocondrial. Além disso, a redução do acúmulo de ROS (Fig. 6) evita danos às próprias mitocôndrias. Isto explicaria por que neste caso, a indicativa redução do $\Delta\Psi_m$ (despolarização) não está associada a apoptose.

O resultado de sobrevivência representado na figura 8, mostrou que a PM melhorou em 29% a tolerância da cepa UCC5181 ao estresse severo de pressão em relação às células pré-tratadas com estresse brando de 50 MPa mais aclimação, antes do mesmo tratamento severo de 100 MPa. Além da vantagem da maior tolerância, as células com PM apresentaram redução do acúmulo de ROS após a

adição do PCA e este acúmulo reduziu ainda mais após o estresse severo de 100 MPa por 30 min (Fig. 6). Tal resultado superou a expectativa de haver menor acúmulo de ROS em células com PM em relação às células que sobrevivem ao estresse apenas com HHP. Pois, neste caso, o acúmulo de ROS foi reduzido a níveis inferiores aos encontrados nas amostras controle (antes de qualquer tratamento).

Os dados apresentados até aqui mostraram que a PM antes do estresse severo de HHP, o qual induz um forte estresse oxidativo nas células, foi capaz de aumentar a tolerância ao estresse e reduzir o acúmulo de ROS em *S. cerevisiae*. Isto comprova que a qualidade mitocondrial está relacionada a tolerância ao estresse. A redução do acúmulo de ROS diante de um estresse tão severo mostrou que estas células foram poupadas dos danos oxidativos, retardando o envelhecimento.

6.3.4 DINÂMICA MITOCONDRIAL

6.3.4.1 Dinâmica mitocondrial em *S. cerevisiae* submetida à HHP

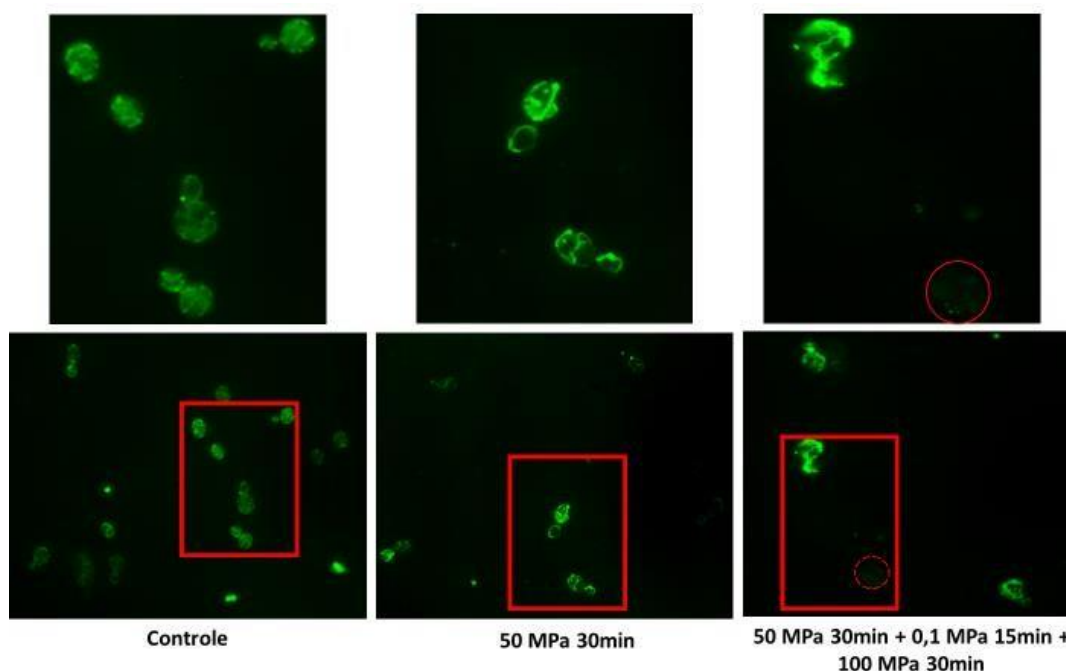


Imagem 4: Imagens de microscopia de fluorescência de *S. cerevisiae* UCC5181 corada com Mitotracker Green-FM. As células foram incubadas por 30 min com Mitotracker Green-FM [400 nmol.L⁻¹]. O comprimento de onda de excitação foi de 488 nm e de emissão foi coletado em 523 nm. As imagens foram feitas em aumento de 100X. O controle foram células coradas sem tratamento. Observa-se no controle o predomínio de células em fissão. Após 50 MPa por 30 min, observa-se aumento do fusão mitocondrial em parte das células. Na sequência, após o tratamento severo de 100 MPa por 30 min nota-se células em fusão e células em aglomeração mitocondrial. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As imagens representam uma de três imagens.

Mutante UCC5181 de *S. cerevisiae* foram submetidas ao estresse de 50 MPa por 30 min, seguido por 15 minutos em aclimação e, consecutivamente foram submetidas a 100 MPa por 30 min. Em cada ponto de tratamento, foram retiradas amostras e incubadas por 30 min em soro bovino pré-aquecido adicionado de Mitotracker Green-FM [400 nmol.L⁻¹], para análises morfológicas das mitocôndrias. A dinâmica mitocondrial revelou mudanças morfológicas desta organela em cada ponto de tratamento. No estado de repouso observamos um predomínio de células com mitocôndrias em fissão, sendo possível até notar formações sugestivas de rede mitocondrial (Imagem 4).

Sabe-se que com a fissão há um aumento na quantidade de mitocôndrias, o que permite que organelas disfuncionais sejam marcadas pela maquinaria da mitofagia. Este processo de renovação é crucial para manter as células saudáveis

com a idade (SEO et al., 2010). A formação de rede mitocondrial nas células visualizadas é um indicativo de células maduras. De acordo com STAB et al (2016), células mais velhas possuem maior número de mitocôndrias e em maior tamanho, formando uma rede de actina altamente interconectada e com distribuição uniforme pelo citoplasma. Como podemos observar, as células jovens são bem menores e a visualização de seu conteúdo interno é mais difícil, no entanto, é possível notar que nelas também prevalece o fissionamento mitocondrial (Imagem 4).

Após o tratamento de 50 MPa por 30 min observamos um predomínio de mitocôndrias em fusão, que promove um aumento da massa mitocondrial. Estudo com mitocôndrias isoladas mostrou que o aumento do $\Delta\Psi_m$ está associado a aumentada probabilidade de fusão, enquanto a despolarização reduz essa probabilidade (TWING et al., 2008). Conforme os resultados de citometria (Fig. 5) e imagens de fluorescência (Imagem 2), o estresse de 50 MPa provocou respectivamente, indicativo aumento do $\Delta\Psi_m$ e de fusão mitocondrial. Estes resultados corroboram com o que foi observado por TWING et al. (2008). Deste modo, o aumento da fusão parece ser uma tentativa de adaptação ao aumento do $\Delta\Psi_m$, já que este processo parece favorecer a troca de conteúdos entre as mitocôndrias danificadas e saudáveis, na tentativa de amenizar disfuncionalidades (STAB et al., 2016). Por outro lado, o processo de fusão atrapalha a mitofagia, interferindo na renovação e qualidade da organela (OULD AMER; HEBERT-CHATELAIN, 2018; TWING et al., 2008).

O consecutivo estresse de 100 MPa por 30 min intensificou ainda mais fusão mitocondrial (Imagem 4). Porém, notamos que algumas leveduras mostraram uma tendência a aglomeração mitocondrial, como mostra a imagem em círculo tracejado vermelho (Imagem 4). Tendo em vista que a intensificação do fusão mitocondrial atrapalha a mitofagia e interfere na renovação mitocondrial (OULD AMER; HEBERT-CHATELAIN, 2018; TWING et al., 2008), concluímos que as células que sobreviveram a todo este tratamento, além do acúmulo de ROS, acumularam também mitocôndrias danificadas, favorecendo o envelhecimento.

6.3.4.2 Dinâmica mitocondrial de *S. cerevisiae* com proteção mitocondrial submetida à HHP

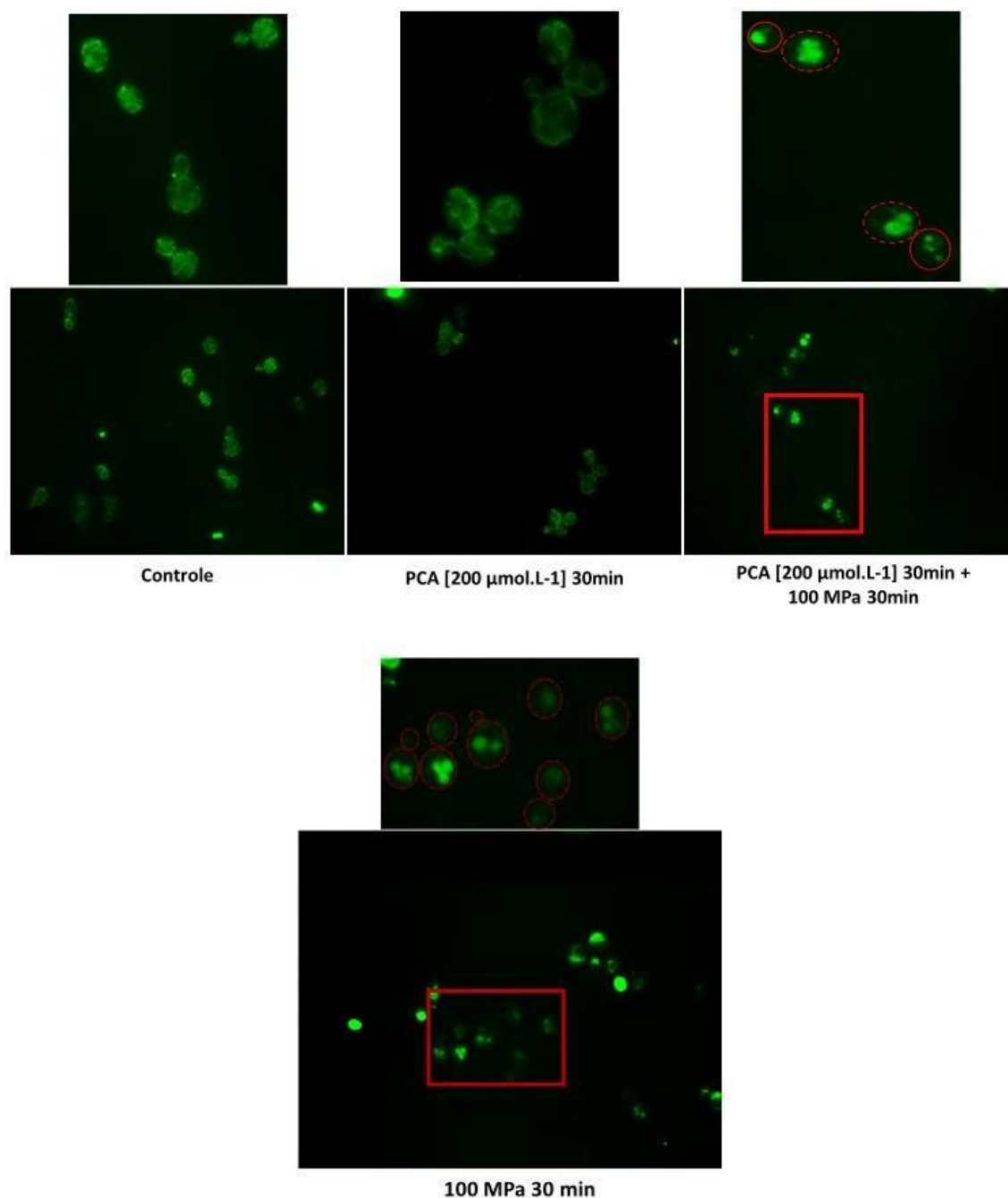


Imagem 5: Imagens de microscopia de fluorescência de *S. cerevisiae* UCC5181 corada com Mitotracker Green-FM. As células foram incubadas por 30 min em Mitotracker Green-FM [400 nmol.L⁻¹]. O comprimento de onda de excitação foi de 488 nm e de emissão foi coletado em 523 nm. As imagens foram feitas em aumento de 100X. O controle foram células coradas sem tratamento. Observa-se no controle o predomínio de células em fissão. Após a PM parece haver uma tendência para fusão mitocondrial. Na sequência, após o tratamento severo de 100 MPa por 30 min nota-se nítida aglomeração mitocondrial, assim como acontece com células submetidas diretamente a 100 MPa por 30 min. Os experimentos foram realizados em triplicatas. As imagens representam uma entre três imagens.

Nesta etapa de experimentos, células de leveduras UCC5181 foram submetidas a um pré-tratamento para PM com PCA antes de serem submetidas ao estresse severo de 100 MPa por 30 min. Observamos a adição do PCA parece não ter provocado mudanças na dinâmica mitocondrial em relação as células sem tratamento (Imagem 5). Após o estresse severo de HHP, observamos que as mitocôndrias se aglomeraram no interior do citoplasma. Da mesma forma, como ocorre nas células submetidas diretamente a 100 MPa sem pré-tratamento (Imagem 5).

Estudos anteriores mostram que a HHP interrompe a organização do citoesqueleto de actina que forma a rede que interconecta as mitocôndrias no citoplasma, levando a aglomeração das mitocôndrias em *S. cerevisiae* mutantes para trealose sintase (FERNANDES, P. M.B.; FARINA; KURTENBACH, 2001). A aglomeração mitocondrial visualizada nas imagens de fluorescência (Imagem 5) é um indicativo de que a PM não impede a desorganização das fibras de actina mediante o estresse severo de pressão, pois a aglomeração das organelas em questão acontece da mesma forma que em células tratadas diretamente com 100 MPa (Imagem 5). No entanto, células com PM apresentaram uma média de tolerância ao estresse de HHP de 92% contra 51% em células sem PM (Fig. 4). Além disso, as leveduras com PM mostraram redução de acúmulo do ROS após o tratamento severo de HHP (Fig. 5).

A avaliação dos resultados apresentados até aqui mostra que apesar do PCA induzir indicativa redução do $\Delta\Psi_m$, essa despolarização não ativa a cascata apoptótica. Além disso, houve preservação da qualidade das mitocôndrias, aumento da tolerância ao estresse com redução do acúmulo de ROS e, na dinâmica mitocondrial, houve aglomeração de mitocôndrias como o observado em células submetidas diretamente ao estresse de 100 MPa. Tal observação demonstra que o PCA não interfere na dinâmica mitocondrial. O aumento da tolerância a HHP e o impedimento do acúmulo de ROS em células com PM indicam o retardamento do processo de envelhecimento celular, apesar da aglomeração mitocondrial.

6.3.5 PCR EM TEMPO REAL EM *S. CEREVISIAE* SUBMETIDA À HHP COM E SEM PROTEÇÃO MITOCONDRIAL

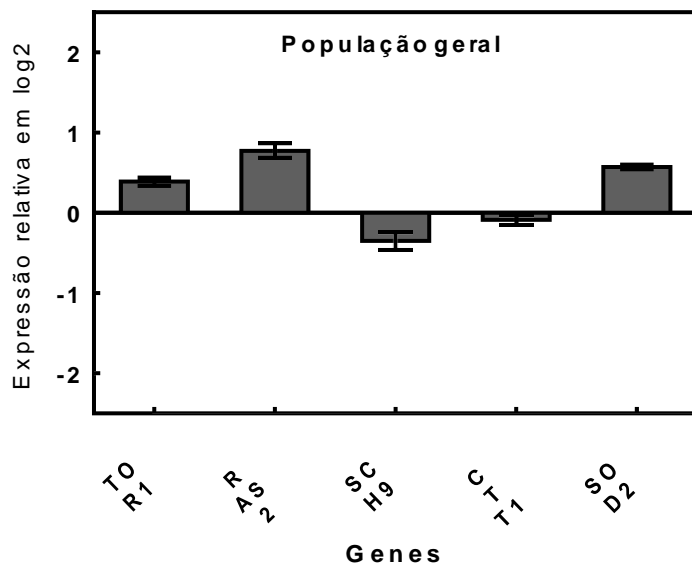


Figura 10: Expressão relativa de *S. cerevisiae* UCC5181 submetida à HHP. Níveis de expressão qTR-PCR da mutante UCC5181 submetida ao estresse de 50 MPa por 30 min, seguido por 15 min em pressão ambiente (0,1 MPa), seguido de 100 MPa 30 min. A alteração em log2 relaciona a expressão relativa da população total de células após o tratamento completo de HHP vs. o controle (células sem tratamento). Os dados foram normalizados com o gene ALG9. Observa-se uma tendência a indução de TOR1, RAS2, SIR2 e SOD2, tendência a repressão de SCH9 e inalteração de SGS1 e CTT1. Os dados exibidos estão em valores de $\log_2 \pm$ SEM de duas replicatas independente.

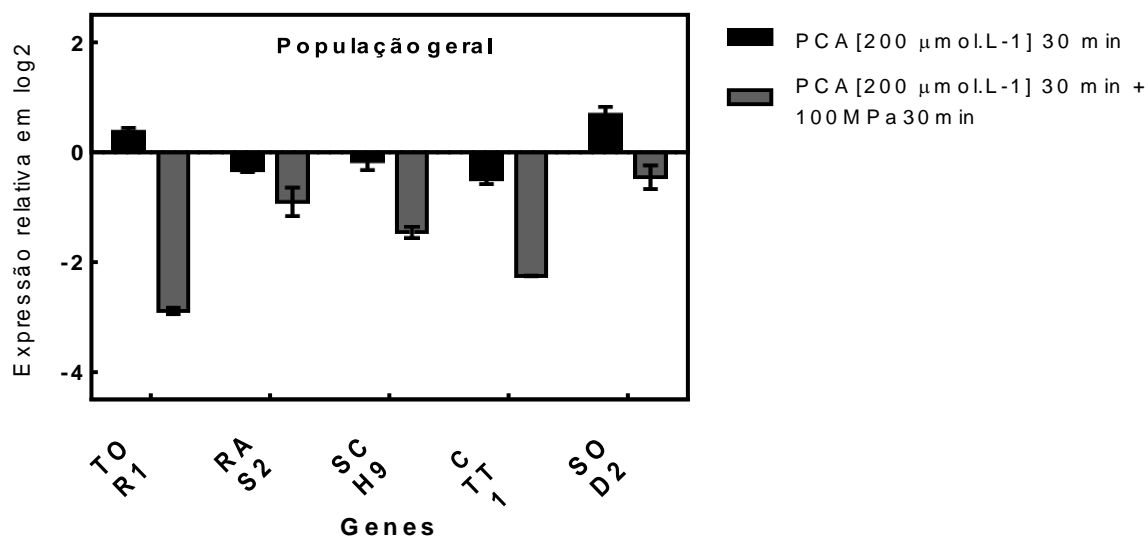


Figura 11: Expressão relativa de *S. cerevisiae* UCC5181 submetida à HHP após PM. Níveis de expressão relativa de mutante UCC5181 foram analisadas após PM com PCA [200 μmol.L-1] por 30 min e, após consecutivo tratamento de 100 MPa por 30 min. A alteração em log2 relaciona a expressão relativa (RQ) da população total de células após cada etapa de tratamento vs. o controle (células sem tratamento). Os dados foram normalizados com o gene ALG9. Observa-se significativa repressão dos genes TOR1, SCH9, CTT1 e tendência a repressão dos genes RAS2 e SOD2. Os dados exibidos estão em $\log_2 \pm$ SEM de duas replicatas independentes.

PCR em tempo real foi realizado em mutante UCC5181 de *S. cerevisiae* submetidas a 100 MPa com pré-tratamento de 50 MPa mais aclimação e, em células pré-tratadas com PCA antes do estresse de 100 MPa. No primeiro ensaio, as células receberam o tratamento subletal de 50 MPa por 30 min, mais aclimação para indução de resistência e, em seguida foram submetidas ao tratamento severo de 100 MPa por 30 min. No segundo ensaio, as células foram pré-tratadas com PCA na concentração aproximada de [200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$] por 30 min para PM e então, foram submetidas ao estresse severo de 100 MPa por 30 min. Foi coletado amostras de células antes e ao fim de todo o tratamento no primeiro ensaio (Fig. 10) e, em cada ponto de tratamento no segundo ensaio (Fig. 11), para as análises por PCR em tempo real. O objetivo foi comparar a expressão de genes envolvidos com envelhecimento e estresse oxidativo em *S. cerevisiae* com indução de tolerância ao estresse severo de HHP utilizando a pressão subletal de 50 MPa, com a expressão destes genes em células com PM antes do estresse de 100 MPa. Assim, demonstrar a influência mitocondrial sobre a regulação de genes do envelhecimento em células submetidas a HHP.

Na análise da população geral das células do primeiro ensaio, observamos uma tendência a indução dos genes *TOR1*, *RAS2* e *SOD2*, tendência a repressão de *SCH9* e não houve alteração da regulação de *CTT1* (Fig. 10). As alterações metabólicas provocadas por este padrão de alteração dos genes são discutidas no capítulo 1 (pag. 49-53). Apesar da análise da população geral mostrar que houve uma alteração mínima do gene *TOR1* ao estresse de HHP, a observação de células mães e filhas separadamente mostrou que este gene não sofre alteração de regulação em células maduras, mas tem uma importante tendência a indução em células jovens (Fig. 3 do cap.1). Esta tendência a indução foi relacionada a menor tolerância das células jovens a HHP, pois a indução do domínio TOR quinase em outros modelos induz o desenvolvimento de anormalidades e senescência (REN et al., 2011).

Diante da análise citada, foi levantada a hipótese que a PM poderia ajudar células menos tolerantes a resistirem melhor ao estresse severo de HHP, pois possivelmente as mitocôndrias também estariam envolvidas com respostas metabólicas retrógradas que influenciariam a expressão de genes envolvidos com o envelhecimento e, não somente genes do envelhecimento comandariam o funcionamento mitocondrial. Como podemos observar na figura 11, após 30 min da

adição do PCA, as leveduras mostraram tendência a indução de TOR1 e SOD2, tendência a repressão de RAS2 e CTT1 e não alterou a regulação de SCH9. As alterações foram pequenas e não podemos afirmar se, neste caso, houve diferenças na regulação destes genes entre células maduras e jovens. No entanto, esses dados foram informados para mostrar que a associação entre mitocôndrias com qualidade preservada e a HHP é que torna capaz a repressão significativa dos genes envolvidos com envelhecimento e, não somente as vias reguladas por estes genes.

As análises das leveduras com PM submetidas à HHP mostraram significativa repressão dos genes TOR1, SCH9 e CTT1, além da tendência a repressão de RAS2 e SOD2. Conforme discutido no capítulo 1, a deleção de TOR1 ou a inibição da sua via de sinalização prolonga o tempo de vida cronológico em *S. cerevisiae*, retardando o envelhecimento, independente do gene antioxidante SOD2, em meio rico em glicose (BONAWITZ et al., 2007). Este ensaio foi realizado em meio rico em glicose, assim, a repressão de TOR1 (Fig. 11) e redução do acúmulo de ROS (Fig. 6) indicam retardamento do envelhecimento destas células, apesar da inibição de SOD2, conforme mostrou BONAWITZ et al. (2007) no seu trabalho.

Na população geral, observamos que a HHP induz aumento na regulação de RAS2 (Fig. 10). No entanto, este aumento foi mais evidente em células jovens que em células maduras (Fig. 3, cap.1). Todavia, em células com PM foi o inverso, a tendência foi para repressão de RAS2 na população geral após a adição do PCA, com maior repressão após a HHP (Fig. 11). Sabe-se que a hiperativação da via RAS2 é altamente oncogênica em organismos superiores e em leveduras induz a formação de pseudo-hifas e desordens de proliferação celular. Por outro lado, a deleção deste gene estende o tempo de vida em leveduras (BROGGI; MARTEGANI; COLOMBO, 2013). As proteínas Ras podem se apresentar em estado ativo quando ligadas a GTP (guanosina trifosfato), ou inativo, quando ligadas a GDP (guanosina difosfato), controlando uma série de sinalizações para proliferação celular. Somente a forma ativada GTP é capaz de emitir sinalizações para proliferação celular (BOQUETT; FERREIRA, 2010).

Estudos mostram que o PCA induz inibição da via Ras/Akt/NF- κ B, reduzindo ações carcinogênicas em humanos por inibir a atividade RAS-GTP (LIN, H. H. et al., 2011). Podemos então notar que a tendência a repressão de RAS2 mostrada na

análise gênica após a adição do PCA proporciona efeitos metabólicos, independente da não significância estatística. O artigo descrito no capítulo 1, resultante deste trabalho, comprova os efeitos metabólicos e fenotípicos provocados por estas pequenas variações gênicas consideradas “tendências” a indução ou repressão.

A tendência à repressão de RAS2 em leveduras com PM submetidas à HHP (Fig. 11) indica inibição desta via com RAS2 ligado ao GDP. RAS2-GTP está envolvido na estruturação do citoesqueleto de actina através das vias de resposta ao estresse (HO; BRETSCHER, 2001). A dinâmica mitocondrial com conformação de mitocôndrias aglomeradas, que ocorre quando há alterações da estrutura das fibras de actina, que ocorreu nas células com PM (Imagem 5), é outra evidência que sustenta que a “tendência” a repressão de RAS2-GDP (Fig. 11) ocasionou efeitos fenotípicos, apesar da não significância estatística. Sendo assim, demonstrou-se que a PM associada a HHP também reprimiu o gene RAS2, envolvido com envelhecimento.

SCH9 (família de proteínas quinases ACG) está envolvido na regulação da biossíntese de esfingolipídios, envelhecimento celular e resposta ao estresse oxidativo e osmótico (QIE et al., 2015). Analisando as figuras 10 e 11, observamos tendência a repressão de SCH9 na população geral submetidas ao tratamento apenas com HHP e significativa repressão nas células com PM antes da HHP. Nota-se que o tratamento de HHP apenas, não altera a expressão deste gene em células jovens, mas induz repressão em células maduras (Fig. 3, cap. 1). Os efeitos da repressão de SCH9 são discutidos no capítulo 1 (pag. 52). A repressão de SCH9 em células com PM antes da HHP indica aumento da remoção de proteínas ubiquitinadas (com defeitos de conformação) e biossíntese de esfingolipídios (Qie et al., 2015; SWINNEN et al., 2014). A remoção de proteínas ubiquitinadas favorece longevidade saudável e a biossíntese de esfingolipídios favorece a estruturação das membranas, tornando-as mais flexíveis e, isto também está relacionado a melhor resistência destas células (SWINNEN et al., 2014) à HHP.

CTT1 e SOD2 são codificadores das enzimas antioxidantes catalase citosólica T1 e superóxido dismutase 2, respectivamente. Acredita-se que Ctt1p desempenhe um papel mais geral como antioxidante à exposição ao estresse oxidativo, já que CTT1 tem sua expressão aumentada por várias condições de estresse, incluindo estresse osmótico, térmico, por esgotamento de nutrientes e por H₂O₂ (GRANT;

PERRONE; DAWES, 1998). Nas vias de resistência ao estresse, Sod2p demonstra ter um papel muito importante na manutenção do tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae* (BONAWITZ et al., 2007). No tratamento que utilizou apenas a HHP, observamos que CTT1 não sofreu alteração e SOD2 apresentou uma tendência a ser induzido (Fig. 10). Após a adição de PCA, observamos uma tendência a repressão de CTT1 e tendência a indução de SOD2. No entanto, quando as células foram posteriormente submetidas a HHP houve repressão de CTT1 e tendência a reprimir SOD2 (Fig. 11).

Observamos nas figuras 3 do capítulo 1, e figuras 10 e 11 deste capítulo, que a regulação de SOD2 acompanha as variações de TOR1. Isto é um indicativo que SOD2 parece ser regulado do TORC1. A inibição dos antioxidantes CTT1 e SOD2 poderia ser um fator negativo neste ensaio, porém, a PM induz menor produção de ROS e a atividade antioxidante do PCA auxiliou na remoção das prováveis baixas taxas de ROS produzidos pelas mitocôndrias protegidas. Estes fatores aliados contribuíram para que este acúmulo ao final do processo fosse inferior ao da fase precedente aos testes (Fig. 6). Assim, na condição do tratamento aqui analisado, a atividade de enzimas antioxidantes foi dispensável.

6.4 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos por análise genômica, mostramos que a PM precedente ao estresse de HHP induz a repressão de importantes genes envolvidos com o envelhecimento como TOR1 e SCH9, além da tendência a repressão de RAS2. Concluimos com este trabalho, que as mitocôndrias não apenas estão envolvidas com o processo de envelhecimento, como têm importante envolvimento com a tolerância ao estresse. Estas organelas, além de serem a principal fonte geradora de energia para as células, também podem influenciar a regulação de genes envolvidos com o envelhecimento e, não somente estes genes influenciam o funcionamento desta organela. Mostramos que a associação do estresse por pressão com um agente que protege mitocôndrias foi um método simples e econômico capaz reprimir genes envolvidos com o envelhecimento, melhorar a tolerância ao estresse de HHP e reduzir o acúmulo de ROS, impedindo danos a outras moléculas e estruturas importantes da célula, retardando o envelhecimento.

Assim, a hipótese levantada de que as mitocôndrias estariam envolvidas com a tolerância ao estresse de HHP e que PM poderia ajudar células antes prejudicadas pela indução dos genes TOR1 e RAS2 pode ser comprovada. Além disso, mostramos que pequenas variações de regulação gênica não devem ser ignoradas por não significâncias estatísticas, pois alterações metabólicas e fenotípicas apresentadas, aliado a resultados referenciados por outros autores, sustentam que são importantes as pequenas variações de expressão em genes reguladores transcricionais como TOR1 e RAS2. Evidências indicaram que a PM induziu despolarização da membrana mitocondrial sem acionar mecanismos apoptóticos. Esta PM também não interferiu na dinâmica mitocondrial das células mediante o estresse severo de pressão, como ocorreu com as células pré-tratadas com o estresse brando de pressão. No entanto, não ficou claro se a aglomeração mitocondrial observada nas células com PM pode acarretar algum prejuízo às células.

Mostramos que o uso de uma ferramenta biotecnológica como a HHP em organismo modelo como a *S. cerevisiae* foi uma aplicação útil que viabilizou compreender um pouco mais o mecanismo de resposta ao estresse, a atividade genômica e o envelhecimento. Deste modo, esta pesquisa pode contribuir com avanços científicos na área do envelhecimento e estresse por pressão, para a

produção de produtos e processos biotecnológicos que possam retardar o envelhecimento e os efeitos deletérios provenientes deste processo. Pode também, contribuir para a produção de cepas de leveduras mais resistentes para a fabricação de produtos que utilizam microrganismos.

7 CONCLUSÃO FINAL DOS CAPÍTULOS 1 E 2

Este trabalho mostrou que células mães e filhas de *S. cerevisiae* respondem diferentemente ao estresse severo de HHP. Diferenças na regulação de genes envolvidos com metabolismo e envelhecimento como TOR1, RAS2 e SCH9 definiram melhor tolerância ao estresse para as células mães. Concluímos que as defesas antioxidantes não foram o principal mecanismo de defesa para a resistência. Pois, células maduras mostraram tendência a inibir os genes antioxidantes CTT1 e SOD2, no entanto resistiram quase três vezes mais que as células jovens a HHP. As células maduras conseguiram manter inalterada a regulação de TOR1, sofreram pequena alteração de RAS2 e tendência a repressão de SCH9, enquanto as células jovens mostraram tendência a induzir TOR1, RAS2, CTT1 e SOD2, porém resistiram menos. Apesar das células maduras serem favorecidas pela melhor regulação dos genes envolvidos com o envelhecimento, o grande acúmulo de ROS foi um problema que favoreceu o envelhecimento.

Nas análises de expressão gênica de células mães e filhas, mostramos que pequenas variações de regulação gênica podem ocasionar importantes diferenças de resposta ao estresse nas células. Portanto, estas pequenas variações não devem ser ignoradas por não significância estatística sem que se avaliem os efeitos fisiológicos que estas pequenas variações podem estar ocasionando nas células.

Observamos que o tratamento subletal de HHP induziu alterações da dinâmica mitocondrial para o fusionamento, o que é considerado um processo importante para a adaptação da célula contra o estresse e redução do acúmulo de danos mitocondrial. Em contrapartida, a PM não interferiu nessa dinâmica, no entanto, não ficou claro se a aglomeração mitocondrial observada nas células com PM pode acarretar algum prejuízo posterior. Serão necessários mais estudos para tal conclusão. Evidências indicaram também que a PM induziu despolarização da membrana mitocondrial sem acionar mecanismos apoptóticos.

Mostramos que a PM favoreceu uma melhor tolerância ao estresse severo de HHP. Isto foi evidenciado pelo aumento da sobrevivência de 71% quando as células foram pré-tratadas com pressão branda contra 92% de sobrevivência quando as células foram pré-tratadas com PCA para a PM. Além disso, a PM impediu o aumento

das espécies reativas mediante o estresse, protegendo as células dos danos oxidativos e retardando o envelhecimento. Deste modo, mostramos que as mitocôndrias podem influenciar a regulação de genes do envelhecimento e favorecer o atraso deste processo, evitando efeitos deletérios associados. CTT1 e SOD2, genes codificadores das enzimas antioxidantes catalase citosólica T1 e superóxido-dismutase 2 também foram reprimidos. Porém, a atividade antioxidante do PCA ajudou a suprir a falta dos antioxidantes.

Mostramos que as mitocôndrias têm importante relação com a resistência celular e podem influenciar a regulação dos genes envolvidos com o envelhecimento e, não somente estes genes regulam o funcionamento dessa organela. Esta influência contribui para o melhor direcionamento do metabolismo celular para os mecanismos de defesa. Assim, mostramos que o uso de uma ferramenta biotecnológica como a HHP em organismo modelo como a *S. cerevisiae* foi uma aplicação útil que viabilizou compreender um pouco mais o mecanismo de resposta ao estresse, a atividade genômica e o envelhecimento. Deste modo, esta pesquisa pode contribuir com avanços científicos na área do envelhecimento e estresse por pressão, para a produção de produtos e processos biotecnológicos que possam retardar o envelhecimento e os efeitos deletérios deste processo. Pode também favorecer a produção de cepas de leveduras mais resistentes para a fabricação de produtos que utilizam microrganismos.

REFERÊNCIA

- AERTSEN, A. et al. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2226–2231, 2005.
- ALMEIDA, B. et al. Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 720–732, 2009.
- ALTMANN, K.; DÜRR, M.; WESTERMANN, B. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 372, n. 1, p. 81–90, 2007.
- ARNOLD, S. The power of life-Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 46–56, 2012.
- BEACH, A. et al. Mechanisms by which different functional states of mitochondria define yeast longevity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5528–5554, 2015.
- BERNSTEIN, K.; GANGLOFF, S.; ROTHSTEIN, R. The RecQ DNA helicases in DNA Repair. **Annual review of genetics Rev Genet**, v. 44, p. 393–417, 2010.
- BONAWITZ, N. D. et al. Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 265–277, 2007.
- BOQUETT, J. A.; FERREIRA, R. J. Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras Biological aspects and tumorigenic activity of the Ras proto-oncogenic family. **Semina : Ciências Biológicas e da Saúde**, n. 2, p. 201–211, 2010.
- BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure and the cell membrane: stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1189, p. 127–132, 2010.
- BRAVIM, F. et al. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1071–1079, 2010.
- BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093–2107, 2013.
- BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure leads to free radicals accumulation in yeast cells triggering oxidative stress. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. 1–9, 2016.
- BROACH, J. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. **Trends in Genetics**, v. 7, n. 1, p. 28–33, 1991.
- BROGGI, S.; MARTEGANI, E.; COLOMBO, S. Nuclear Ras2-GTP controls invasive growth in *saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79274, 2013.

CAO, L. L. et al. Control of mitochondrial function and cell growth by the atypical cadherin Fat1. **Nature**, v. 539, n. 7630, p. 575–578, 2017.

CAPELSON, M.; HETZER, M. W. Development and Disease. **Molecular Biology**, v. 15, n. June, p. 1–9, 2009.

CHEN, F. et al. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 1483–1495, 2017.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 2014.

FERNANDES, P. M.B.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42–46, 2001.

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure ? **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 38, n. 8, p. 1239–1245, 2005.

FERNANDES, P. M. B. et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS letters**, v. 556, n. 1–3, p. 153–160, 2004.

FIALKOVA, V. et al. DNA methylation as mechanism of apoptotic resistance development in endometrial cancer patients. **General Physiology and Biophysics**, v. 36, n. 5, p. 521–529, 2017.

FIGGE, M. T.; OSIEWACZ, H. D.; REICHERT, A. S. Quality control of mitochondria during aging: Is there a good and a bad side of mitochondrial dynamics? **BioEssays**, v. 35, n. 4, p. 314–322, 2013.

FINKEL, T. The metabolic regulation of aging. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1416–1423, 2015.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871–879, 2005.

GOODSELL, D. S. Miniseries : Illustrating the Machinery of Life Mitochondrion *. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, n. 3, p. 134–140, 2010.

GRANT, C. M.; PERRONE, G.; DAWES, I. W. Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, v. 253, n. 3, p. 893–898, 1998.

GREDILLA, R.; GRIEF, J.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 4, p. 439–447, 2006.

HO, J.; BRETSCHER, A. Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 6, p. 1541–1555, 2001.

HÖHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biology**, v. 11, n. 2017, p. 482–501, 2017.

IWAHASHI, H. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2847–2852, 2005.

KARATHIA, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism : A Comparative Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2011.

KNORRE, D. A. et al. How do yeast sense mitochondrial dysfunction? **Microbial Cell**, v. 3, n. 11, p. 532–539, 2016.

LEE, C. P. et al. MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress. **Plant Journal**, v. 88, n. 5, p. 809–825, 2016.

LIN, H. H. et al. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 237–254, 2011.

LIN, S. J.; DEFOSSEZ, P. a; GUARENTE, L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5487, p. 2126–2128, 2000.

LIPPUNER, A. D.; JULOU, T.; BARRAL, Y. Budding Yeast as a Model Organism to Study the Effects of Age. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 2, p. 300–25, 2014.

LIU, Y. M. et al. Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 430–437, 2008.

LU, S. P.; LIN, S. J. Regulation of yeast sirtuins by NAD⁺ metabolism and calorie restriction. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 8, p. 1567–1575, 2010.

MORELLI, A. M. et al. An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. **Open Biology**, v. 9, n. 4, 2019.

MUTHUKUMARAN, J. et al. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 4, p. 304–309, 2013.

NAMRATA, C. et al. A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. July, p. 1–15, 2014.

ORTELLS, M. C. et al. Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4368–4384, 2012.

OSIEWACZ, H. D.; BERNHARDT, D. Mitochondrial quality control: impact on aging and life span. **Gerontology**, v. 59, p. 413–420, 2013.

OULD AMER, Y.; HEBERT-CHATELAIN, E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1859, n. 9,

p. 868–877, 2018.

PALHANO, F. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 447–457, 2004.

PEREIRA, D. M. et al. Toxicity of phenolipids: Protocatechuic acid alkyl esters trigger disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation in macrophages. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 206, p. 16–27, 2017.

PERELMAN, A. et al. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 11, p. 1–7, 2012.

PERRY, S. W. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide Seth. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98–115, 2011.

PETKOVA, M. I. et al. Mtl1 is required to activate general stress response through TOR1 and RAS2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19521–19531, 2010.

PICARD, M. et al. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 6, p. R393–R406, 2013.

PORPORATO, P. E. et al. Mitochondrial metabolism and cancer. **Cell Research**, v. 28, n. 3, p. 265–280, 2018.

PYATRIKAS, D. V. et al. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 12, 2015.

QIE, B. et al. Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. **Redox Biology**, v. 5, p. 290–300, 2015.

RAJASEKARAN, A. et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 48, p. 10–21, 2015.

RATTANAWONG, K.; KERDSOMBOON, K.; AUESUKAREE, C. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione are involved in response to oxidative stress induced by protein denaturing effect of alachlor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 963–971, 2015.

REN, M. et al. Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 3, p. 1367–1382, 2011.

RODRÍGUEZ, G. E. et al. Morphological abnormalities in mitochondria of the skin of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Archivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 1, p. 45–51, 2012.

SEO, A. Y. et al. New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 15, p. 2533–2542, 2010.

SLACK, C. et al. The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. **Cell**, v. 162, n. 1, p. 72–83, 2015.

SON, J. H. et al. Protective effect of protocatechuic acid against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. **Biomedical Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2018.

SOUSA, J. S.; IMPRIMA, E. D.; VONCK, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. In: HARRIS, J.; BOEKEMA, E. **Membr. Protein Complexes Struct. Funct.** Singapore: Springer, 2018. p. 167–227.

STAB, B. R. et al. Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. DEC, p. 1–10, 2016.

SUN, N.; YOULE, R. J.; FINKEL, T. The Mitochondrial Basis of Aging. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 654–666, 2016.

SWINNEN, E. et al. Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 17–32, 2014.

SYED, S.; SCHMIDT, K. H. Sgs1 Binding to Rad51 Stimulates Homology-Directed. v. 208, n. January, p. 125–138, 2018.

TORRE-RUIZ, M. A. et al. Signalling Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: LUSHCHAK, V. **Oxidative Stress - Mol. Mech. Biol. Eff.** Spain: In Tech, 2012. p. 255–277.

TREVISOL, E. T. V. et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 697–704, 2011.

TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433–446, 2008.

TWIG, G.; LAS, G.; SHIRIHAI, O. S. Autophagy in the Homeostasis of Pancreatic β -Cells. **Autophagy Heal. Dis.** Elsevier, 2013. p. 89–100.

URBAN, J. et al. Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 26, n. 5, p. 663–674, 2007.

WIERMAN, M. B.; SMITH, J. S. Yeast sirtuins and the regulation of aging. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 73–88, 2014.

ZADRAŃ-GĘCZA, R. et al. Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects. In: SKONECZNY, M. **Stress Response Mech. Fungi**. 1. ed. Poland: Springer International Publishing, 2018. p. 1–34.

ZEMIRLI, N.; MOREL, E.; MOLINO, D. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–19, 2018.

ZHANG, G. X. et al. Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat. **Am J**

Physiol Heart Circ Physiol, v. 298, n. 2, p. H433-9, 2010.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 1 jul. 2018.