

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Diego Trindade de Souza**

**Análise da expressão dos genes relacionados à  
parede celular e à membrana plasmática de  
*Saccharomyces cerevisiae* em resposta  
a alta pressão hidrostática**

Vitória – ES

2012

Diego Trindade de Souza

Análise da expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a alta pressão hidrostática

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo sob a orientação da Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Vitória – ES  
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

“Análise da expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a alta pressão hidrostática”

DIEGO TRINDADE DE SOUZA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)  
Orientadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães (UFES)  
Membro Interno

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fernanda Bravim (UFES)  
Membro interno

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Akio Masuda (UFRJ)  
Membro externo

Vitória-ES, 28 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais, Francisco e Terezinha,  
e aos meus irmãos, Fabiane e Bruno,  
com muito carinho.

## Agradecimentos

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia M.B. Fernandes pela oportunidade oferecida e pela orientação.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> A. Alberto R. Fernandes pelo convite para fazer parte do grupo e pela disponibilidade em ajudar nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. James R. Broach e a Dra. Soyeon Lippman do Departamento de Biologia Molecular, da Universidade de Princeton, que contribuíram para a análise de microarranjo realizada neste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela atenção e ensinamentos.

Aos antigos e atuais colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio: Adriana, Bárbara, Carol, David, Diana, Driele, Érica, Fernanda, Fábio, Frederico, Glória, Helber, Paolla, Lorena, Mainã, Máisa, Maurício, Rayster, Renato, Suelen, Vitor, Thaiz, Walkiria, Zaca pela contribuição científica e, principalmente, pelo bom convívio nestes dois anos de trabalho.

Ao Lucas que contribui tanto com as ideias quanto para produção dos algoritmos. À Fernanda pela imensa ajuda nos experimentos de PCR em tempo real e em toda a produção deste trabalho. E também, à Érica e ao David que também ajudaram para construção textual deste trabalho.

Às agências de fomento: FINEP, CNPq, CAPES e FAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1.- INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1.- <i>A Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
1.2.- Parede celular .....	15
1.3.- Membrana plasmática.....	16
1.4.- Resposta celular ao estresse.....	17
1.5.- Vias de sinalização .....	18
1.5.1.- Proteína quinase A e resposta geral ao estresse .....	19
1.5.2.- HOG - resposta a alta osmolaridade do glicerol .....	19
1.5.3.- Via de Integridade de celular .....	20
1.5.4.- Proteína serina/treonina quinase .....	20
1.5.5.- Fator de transcrição de choque térmico .....	21
1.5.6.- <i>YAP1</i> .....	21
1.6.- A alta pressão hidrostática.....	22
1.7.- A resposta à alta pressão hidrostática .....	24
1.8.- Microarranjo .....	26
<b>2.- OBJETIVO GERAL</b> .....	28
<b>3.- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1.- Linhagens utilizadas, condições de crescimento e tratamento de pressão ...	29
3.2.- Análise de microarranjo .....	29

3.2.1.- Análise do mRNA .....	29
3.2.2.- Normalização dos dados .....	30
3.2.3.- Implementação computacional .....	31
3.3.- Confirmação dos dados de microarranjo por RT-PCR em tempo real.....	36
<b>4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1.- Análise da expressão de genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática.....	39
4.1.1.- Análise dos genes relacionados à biogênese dos componentes da parede celular .....	40
4.1.2.- Análise dos genes relacionados à biogênese da membrana plasmática.....	44
4.1.3.- Análise dos genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides.....	45
4.1.4.- Análise dos genes relacionados ao metabolismo de polissacarídeos de parede celular .....	49
4.1.5.- Análise dos genes localizados na parede celular .....	49
4.1.6.- Análise dos genes localizados na membrana plasmática.....	50
4.1.7.- Análise dos genes intermembranares e endomenbranares .....	53
4.2.- Comparação com o estresse por alta pressão em longos períodos .....	55
4.2.1.- Análise dos genes relacionados à parede celular .....	55
4.2.2.- Análise dos genes relacionados à membrana .....	59
4.3.- Caracterização hierárquica da pressão com outros estresses.....	64
4.4.- Avaliação dos fatores de transcrição responsáveis pela resposta ao estresse da parede e membrana celulares .....	67
4.5.- Confirmação dos genes por RT-PCR em tempo real.....	73
<b>5.- CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6.- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>77</b>
<b>7.- ANEXOS .....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados como <i>primers</i> na reação de RT-PCR em tempo real .....	38
Anexo 1 - Valores de expressão dos genes induzidos relacionados com a parede celular e membrana plasmática nos diferentes tempos pós-tratamento com alta pressão hidrostática. ....	96
Anexo 2 -- Valores de expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática nos tratamentos de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h (IWAHASHI et al., 2003). ....	99
Anexo 3 .-- Valores de expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática nos tratamentos de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15min e 40 MPa por 16 h (IWAHASHI et al., 2003). ....	102

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de blocos que apresenta o funcionamento dos programas para produção dos (a) gráfico de expressão e (b) Comparação dos estresses. ....33
- Figura 2 - Diagrama de blocos que mostra o funcionamento dos programas produzidos (a) para a construção do mapa quente e (b) análise dos fatores de transcrição.....35
- Figura 3- Expressão relativa dos 204 genes relacionados à biogênese dos componentes da parede celular medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. ....41
- Figura 4 - Expressão relativa dos 6 genes relacionados à pela biogênese da membrana plasmática medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. ....45
- Figura 5 - Expressão relativa dos 283 genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. ....46
- Figura 6- Expressão relativa dos 62 genes relacionados ao metabolismo de polissacarídeos medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. ....48
- Figura 7 - Expressão relativa dos 43 genes localizados na parede celular medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. 50
- Figura 8** - Expressão relativa dos 172 genes localizados na membrana plasmática medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.....51
- Figura 9 - Expressão relativa dos 158 dos genes intermembranares e endomenbranares medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos. ....54

Figura 10 – Gráfico de correlação dos genes relacionados à parede celular (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes. ....56

Figura 11- Gráfico de correlação dos genes relacionados à parede celular (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes. ....58

Figura 12- Gráfico de correlação dos genes relacionados à membrana plasmática (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes. ....61

Figura 13- Gráfico de correlação dos genes relacionados à membrana plasmática (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes. ....62

Figura 14– Dendograma Geral com classificação hierárquica de vários estresses. As cores vermelhas representam os genes induzidos, enquanto as verdes representam os genes reprimidos. Os aumentos apresentam os clados com os tratamentos com a HHP em que (A) representa o tratamento de 50MPa por 30 min, 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 5min, 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 10min e 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 5min; (B) 200 MPa por 30min; e (C) 40 MPa por 16h.....65

Figura 15– Rede de regulação dos fatores de transcrição superexpressos e seus respectivos alvos também induzidos no tratamento de 50 MPa por 30 min. As cores representam a conectividade do gene na rede na qual as cores verdes apresentam pouca conectividade e vermelhas muito conectividade.....69

Figura 16- Rede de regulação dos fatores de transcrição superexpressos e seus respectivos alvos também induzidos no tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15 min. As cores representam a conectividade do gene na rede na qual as cores verdes apresentam pouca conectividade e vermelhas muito conectividade. ....72

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP = Ampicilina

ATP = Adenosina trifosfato

ATPase = Catalisa a hidrólise de ATP

cDNA = Ácido desoxirribonucléico complementar

D.O. = Densidade óptica

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DNase = Catalisa a quebra de DNA

dNTP = Desoxirribonucleotídeotrifosfatado

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESR = Resposta ao estresse ambiental

GEO = Gene Expression Omnibus

HHP = Alta pressão hidrostática

HOG = resposta a alta osmolaridade do glicerol

HSF = fatores de transcrição de choque térmico

HSP = Proteína de choque térmico

MA = microarranjo

MIPS = Centro de informação de Munique sobre proteínas sequenciadas

MPa = Megapascal

mRNA = RNA mensageiro

NAD<sup>+</sup> = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

ORF = *Open reading frame* (Janela aberta de leitura)

PCR = Reação em cadeia da polimerase

pH = Potencial hidrogeniônico

PKA = Proteína quinase A

PKC = Proteína quinase C

RNA = Ácido ribonucléico

rpm = Rotação por minuto

RT = Transcriptase reversa

STRE = Elementos de resposta ao estresse

YEPD = Extrato de lêvedo, peptona dextrose

## RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um conhecido microrganismo que recebe grande atenção por sua aplicação biotecnológica industrial. Entretanto, durante o processo industrial, as leveduras ficam expostas aos mais diferentes tipos de estresses. Conhecer os mecanismos de resposta aos diversos estresses é fundamental para obter maiores rendimentos no setor industrial. A alta pressão hidrostática (HHP) é um estresse que exerce um amplo efeito sobre a *S. cerevisiae*, interferindo nas membranas celulares, arquitetura celular, além dos processos bioquímicos. Neste trabalho, utilizou-se a técnica de microarranjo para verificar a influência da HHP nos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática. Para isso, células da linhagem BT0605 foram submetidas ao tratamento de pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min; e depois incubadas a pressão ambiente por 5, 10 e 15 min. Os resultados do microarranjo demonstraram claramente, que entre os genes envolvidos com a biogênese da parede celular, os que estão relacionados com a proteção deste envoltório foram prontamente ativados pela alta pressão, enquanto os genes envolvidos na estrutura da parede celular necessitaram de pelo menos 5 minutos à pressão ambiente para serem induzidos. Vários genes envolvidos na biossíntese de lipídeos de membrana foram induzidos em todos os tratamentos, sugerindo uma possível relação com a proteção e reparo da membrana plasmática. Curiosamente, os tratamentos induziram vários genes relacionados com a via de sinalização proteína quinase A, a qual tem uma relação negativa na maioria dos estresses. A ativação da via PAS quinase, sugere que ela tenha uma função essencial na resposta ao estresse por pressão, uma vez que esta via está envolvida na modulação do metabolismo de glicogênio e de  $\beta$ -glucano. Ainda, a partir dos dados de microarranjo pode-se identificar os principais fatores de transcrição, envolvidos na resposta da parede celular e membrana plasmática, que foram ativados imediatamente (*MSN4*, *YAP1*, *ADR1* e *NRG1*) e 15 min após o piezotratamento (*MSN4*, *YAP1*, *ADR1*, *HSF1*, *CIN5*, *GIS1*, *INO4* e *CST6*). Estes resultados contribuem para o entendimento da resposta à HHP dos genes relacionados à parede celular e membrana plasmática. Além disso, este estudo poderá ajudar na investigação para aquisição de mecanismo de tolerância aos diferentes estresses nos processos biotecnológicos.

Palavras-chave: piezotratamento, estresse, levedura, análise temporal, microarranjo

## ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has received much attention for its applications in the biotechnology industry. However, during these processes, yeasts are exposed to many different types of stress. Knowing the mechanisms *S. cerevisiae* uses to respond to these stresses is essential for obtaining higher yields in the industrial sector. High hydrostatic pressure (HHP) is a stress that exerts a broad effect on *S. cerevisiae*, interfering with cell membranes, cellular architecture, and various biochemical processes. In this study, we used the microarray technique to investigate the influence of HHP on genes related to the cell wall and plasma membrane. For this, cells from BT0605 strain were subjected to hydrostatic pressure of 50 MPa for 30 min, and then incubated at ambient pressure for 5, 10 and 15 min. The microarray results clearly demonstrated that of the genes involved in biogenesis of the cell wall, those which are related to protection were readily activated by high pressure, whilst the genes involved in cell wall structure required 5 minutes on the ambient pressure to be induced. Multiple genes involved in lipid biosynthesis were induced by all treatments, suggesting a possible relationship with the protection and repair of the plasma membrane. Interestingly, all treatments induced several genes related to the PKA signalling pathway, which are repressed in most stresses. Activation of the PAS kinase pathway, involved in the modulation of glycogen and  $\beta$ -glucan metabolism, suggests that this also has an essential function in the response to pressure. The cluster of genes related to the cell wall and plasma membrane which were activated in response to HHP, showed great similarity to results in the literature following supplementation by  $\text{Ca}^{2+}$  (0.4 M) together with the calcineurin inhibitor FK506 (1.0 g/ml), particularly after 15 minutes at ambient pressure. Microarray data also demonstrated the activation of key transcription factors, either immediately (*MSN4*, *YAP1*, *ADR1* and *NRG1*) or 15 min after pressure treatment (*MSN4*, *YAP1*, *ADR1*, *HSF1*, *CIN5*, *GIS1*, *INO4e* and *CST6*). These results contribute to understanding the response to HHP of genes related to cell wall and plasma membrane. Furthermore, this study may help in the investigation mechanism for the acquisition of tolerance to different stresses in biotechnological processes.

Key words: piezotreatment, stress, yeast, Temporal Analysis, microarray

## 1.- INTRODUÇÃO

### 1.1.- A *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular definida. A *Saccharomyces cerevisiae* é pertencente ao grupo Ascomporogenous, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoide que contém 26 gêneros, entre eles, o gênero *Saccharomyces*. Entre as características que diferenciam este gênero, podem ser citadas: espécies com alta capacidade fermentativa, divisão por germinação ou brotamento, e que possuem ascósporos ovais que não são liberados do asco durante a reprodução. As células de *Saccharomyces cerevisiae* têm a forma elipsoidal, com tamanho que varia de 5-10  $\mu\text{m}$  no diâmetro maior e 1-7  $\mu\text{m}$  no diâmetro menor. Geralmente, a média de volume celular é de 29 ou 55  $\mu\text{m}^3$  para uma célula haplóide ou diplóide, respectivamente. O tamanho da célula pode aumentar com a idade (KREGGER-VAN RIJ, 1987).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um conhecido microrganismo que recebe grande atenção por sua aplicação biotecnológica industrial, amplamente utilizados em indústrias de fermentação para produção de massas, bebidas, biocombustíveis e fármacos, e desde meados da década 1930 tem sido utilizada como organismo experimental (ROMAN, 1981). A elegância da genética das leveduras, a fácil manipulação das células, e, também, o avanço técnico de transformação de leveduras para ser usado em genética reversa, contribuíram para o enorme crescimento da utilização desse organismo na biologia molecular (BROACH et al., 1991; GUTHRIE; FINK, 1991).

A comprovada similaridade dos mecanismos de replicação, da recombinação, da divisão celular e dos metabolitos produzidos que são, geralmente, conservados entre a levedura e os organismos superiores a torna um organismo modelo para estudo em células eucarióticas. Não há nenhum outro organismo eucarioto em que tantos mecanismos já tenham sido elucidados pelas análises bioquímicas e genéticas em diferentes áreas da biologia celular e molecular (FERNANDES, 2005).

## 1.2.- Parede celular

A camada mais externa do envelope celular da levedura é a parede celular que é uma robusta estrutura que proporciona proteção física contra estresse, controle osmótico e manutenção da forma da célula (SMITH et al., 2000; KLIS et al., 2006), além de permitir livre permeabilidade para solutos menores que 600 Da (SCHERRER et al., 1974).

A parede celular da levedura é bastante espessa com cerca de 100 a 200 nm, seus principais constituintes são os polissacarídeos, principalmente, glucanos, mananas e em menor proporção a quitina. Análises por microscopia eletrônica, usando coloração negativa, revelam uma estrutura em camadas com uma camada elétron-transparente interna de cerca de 70-100 nm de espessura que depende das condições de crescimento e perfil genético e uma camada elétron-densa externa (OSUMI, 1998).

Para a construção da parede celular a *Saccharomyces cerevisiae* gasta grande quantidade de energia. Dependendo da condição de crescimento, a sua massa em termos de peso seco pode ser responsável por cerca de 10-25% da massa total da célula (AGUILAR-USCANGA; FRANCOIS, 2003).

A resistência mecânica da parede é devida, principalmente, à camada interna, que consiste em  $\beta$ 1,3-glucano e quitina e representa cerca de 50-60% do peso seco da parede. A camada externa consiste em manoproteínas fortemente glicosiladas que saem da superfície celular (CAPPELLARO et al., 1994; BABA; OSUMI 1987) e estão envolvidas, entre outras funções, com o reconhecimento de mudança no meio.

A construção da parede celular é rigorosamente controlada. A composição de polissacarídeos, estrutura e espessura da parede variam consideravelmente, dependendo da condição ambiental (KLIS et al., 2006).

### 1.3.- Membrana plasmática

A membrana plasmática forma uma bicamada lipídica com aproximadamente 7,5 nm de largura. Ela contém uma mistura assimétrica de lipídios e proteínas polares que por suas interações governam a estrutura da membrana. A membrana plasmática contém proteínas envolvidas no transporte de soluto, transdução de sinais, ancoragem de citoesqueleto e síntese de componentes externos à membrana (VAN DER REST et al., 1995).

A composição lipídica do folheto interno da membrana plasmática é rica em fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina, enquanto o folheto externo contém fosfatidilcolina e esfingolipídios (CHENG; MICHELS, 1991; OP DEN KAMP, 1979). Uma característica marcante dos lipídeos de membrana plasmática é a sua diversidade em tamanho e composição, sendo as principais classes, glicerofosfolípidos, esfingolipídios e esteróis.

Glicerofosfolípidos consistem de duas cadeias de ácidos graxos ligados ao glicerol-3-fosfato. Diversos outros substituintes, tais como colina, etanolamina, serina, mioinositoleglicerol podem estar ligados ao grupo fosforil. Esfingolipídeos tem uma espinha dorsal de ceramida, que é composta de uma longa cadeia base de fitoesfingosina que é N acilado com 1-hidroxi no C26 do ácido graxo. Esteróis são compactas e rígidas moléculas hidrofóbicas com um grupo hidroxila polar.

Assim, a função primária da membrana celular da levedura é fornecer permeabilidade seletiva, ou seja, controlar quem entra e quem sai do citosol. Mais importante é o papel das proteínas de membrana na regulação da nutrição da levedura, tais como absorção de carboidratos, compostos nitrogenados e íons, e a extrusão de moléculas perigosas para a célula. Outros aspectos importantes incluem a exo e a endocitose de moléculas carregadas, as resposta ao estresse e a esporulação (VAN DER REST et al., 1995).

#### 1.4.- Resposta celular ao estresse

Qualquer mudança ambiental que altere as condições de sobrevivência de uma célula é frequentemente referida como estresse e tais condições induzem a uma resposta celular particular ao dano causado. Um organismo unicelular, assim como a levedura, constantemente não está inserido em um ambiente em que todas as condições ótimas são fornecidas, tais como temperatura, osmolaridade e disponibilidade de nutrientes. Em dornas de fermentação, por exemplo, as leveduras enfrentam estresse por choque térmico, etanol (MORAIS et al., 1997; VICENTE et al., 2006).

As fortes mudanças nas condições ambientais conduzem uma série de mecanismo de reposta, como por exemplo, a adaptação ao crescimento e a proliferação celular, o rápido ajuste no metabolismo e no programa de expressão gênica para que a célula se adapte a uma nova situação (HOHMANN; MAGER, 2003; FERNANDES, 2008).

E não somente isso, já é conhecido que o mecanismo de reposta ao estresse é conservado entre todos os organismos, o qual procura defender a célula dos danos causados pela condição desfavorável, com mecanismos que agem tanto no reparo de lesões, produzidas pelo estresse, quanto no mecanismo adquirido de tolerância ao estresse (HOHMANN; MAGER, 2003; DING et al., 2009; BELLOCH et al., 2008; STRASSBURG, et al., 2010).

Outros fatos interessantes envolvidos com a resposta ao estresse, já descritos na literatura, são: a resposta adaptativa e a resposta cruzada. A primeira, conhecida pela aquisição de tolerância a um estresse letal que a célula adquire depois de submetida a um estresse brando (GROSS; WATSON, 1998). E a segunda se refere à aquisição de tolerância a diferentes tipos de estresse depois de submetida a um estresse qualquer, que demonstra, além de tudo, que há uma resposta celular comum entre os estresses (ÇAKAR et al., 2005; HOHMANN; MAGER, 2003; FOLCH-MALLOL et al., 2004).

A rede bioquímica da célula para realizar a resposta ao estresse segue três funções principais: (1) ela deve inferir a partir de ruídos, que são estímulos recebidos do

provável estado ou estados do ambiente extracelular e, potencialmente, dos prováveis estados futuros; (2) para que dado os estados mais prováveis, a célula possa decidir uma resposta apropriada pesando entre as vantagens e desvantagens de cada potencial de resposta; (3) e deve implementar essas funções usando uma estratégia que é evolutivamente estável e assim permitir que uma população de células supere seus rivais e sobreviva às catástrofes ambientais (PERKINS; SWAIN, 2009).

Compreender os mecanismos e identificar quais os principais genes para a sobrevivência celular sob as condições estressantes são de grande interesse econômico e social, não só pela possibilidade de aplicação biotecnológica, produzindo organismos que melhor se adaptem as condições industriais, bem como, contribuindo para o entendimento de patologias, pois a viabilidade da célula depende da sua capacidade de adaptar-se ao ambiente que a cerca e de manter-se em condições favoráveis para sua proliferação (MURRAY et al., 2004).

#### 1.5.- Vias de sinalização

Muitas das respostas ao estresse envolvem mudanças na expressão gênica que exigem vias de transdução de sinais para conectar os sensores que estão localizados na superfície celular ou no citoplasma à maquinaria transcricional, localizada no núcleo (IGUAL; ESTRUCH, 2000). Cada via ativa um ou mais fatores de transcrição que regulam a expressão de um conjunto de genes característicos no núcleo, sendo que em alguns casos, como na resposta geral ao estresse, o fator de transcrição se acumula no núcleo após a imposição do estresse (GÖRNER et al., 1998), em outros casos ocorre uma translocação nucleocitoplasmática no início da via, e o fator de transcrição é ativado dentro do núcleo, como ocorre na via de HOG (*The High Response* - resposta a alta osmolaridade do glicerol) (REISER et al., 1999).

Uma variedade de fatores de transcrição ativados por estresse já foram identificados, entre eles, destacam-se os que são sinalizados pelas vias mostradas a seguir.

### 1.5.1.- Proteína quinase A e resposta geral ao estresse

A via de cAMP-PKA está relacionada ao controle de muitos processos celulares, incluindo detecção de nutrientes, regulação de proliferação celular, armazenamento de carbono e resposta ao estresse. Sua ativação causa alterações transitórias em vários sistemas, incluindo o metabolismo de trealose e glicogênio, glicose e gliconeogênese, que contêm componentes controlados pela fosforilação mediada por PKA (THEVELEIN; DE WINDE, 1999). Grupos de genes que são negativamente regulados pela via de cAMP-PKA são ativados em resposta a várias condições de estresse (IGUAL; ESTRUCH, 2000).

As observações nos estudos desta via sugerem a existência de um mecanismo integrado de resposta a diferentes formas de estresse, a chamada resposta geral ao estresse, os quais verificaram a existência de um elemento cis-regulatório comum que foi designado como elementos de resposta ao estresse (STRE, sigla em inglês). Em relação aos fatores trans-ativadores envolvidos na expressão de genes que contêm os elementos STRE foi mostrado que duas proteínas, Msn2p e Msn4p, se ligam especificamente a essa sequência (Martínez-Pastor et al., 1996). A via de PKA está envolvida na localização de Msn2p e Msn4p, na qual há uma relação inversa na correlação entre a atividade de PKA e a localização nuclear dessas proteínas (IGUAL; ESTRUCH, 2000).

### 1.5.2.- HOG - resposta a alta osmolaridade do glicerol

As vias MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) têm sido implicadas em muitos programas biológicos de leveduras incluindo, crescimento de pseudohifa, integridade celular, esporulação e resposta a alta osmolaridade. A via de HOG é uma via MAPK ativada por estresse, que parece ser ativada por um sinal específico, o aumento da osmolaridade no meio (TOONE; JONES, 1998). Esta via consiste de uma cascata de quinases que, quando ativada, culmina na fosforilação e ativação da proteína quinase Hog1p.

Vários genes regulados através da via de HOG contêm o elemento de resposta ao estresse que são alvos desta via (SCHÜLLER et al., 1994). Proft et al. (2005) mostrou

que a indução do fator de transcrição *SKO1*, pelo estresse osmótico, contribui para um aumento de 50% na expressão do gene *MSN2*.

#### 1.5.3.- Via de Integridade de celular

*S. cerevisiae* contém um homólogo da proteína quinase C de mamíferos que é codificada pelo gene *PKC1* (DAVENPORT et al., 1995). A via de PKC em leveduras é essencial para a manutenção da integridade celular em resposta a estresses ambientais e processos morfogênicos que desafiem a força da parede celular (IGUAL; ESTRUCH, 2000). Esta via desempenha um papel fisiológico na adaptação ao estresse térmico e hiposmótico (KAMADA et al., 1995; DAVENPORT et al., 1995).

Sabe-se que, estiramento tanto na parede celular e/ou na membrana plasmática ativam a via de PKC a fim de manter a integridade celular, estimulando a biossíntese da parede celular (IGUAL; ESTRUCH, 2000). A manutenção da integridade celular ocorre em dois eventos combinados: a biossíntese de componentes da parede celular e a montagem de um citoesqueleto de actina polarizado, que direciona as vesículas secretoras aos locais de crescimento da superfície.

#### 1.5.4.- Proteína serina/treonina quinase

PAS quinase, proteína serina/treonina quinase, conservada desde leveduras até os seres humanos, é um membro recém-descoberto de proteínas quinase envolvidas na percepção de nutrientes (RUTTER et al., 2001). Em leveduras, PAS quinase regula o particionamento de glicose através da fosforilação da enzima UDP-glicose pirofosforilase (*Ugp1p*) que produz UDP-glicose, um doador imediato de glicose para glicogênio e biossíntese de glucano da parede celular (SMITH; RUTTER, 2007).

A atividade da PAS quinase é regulada pelo estado metabólico e por estresses que afetam a integridade da parede celular. PAS quinase em levedura atua como

integrador sensorial que coordena o destino da glicose intracelular dependendo da demanda metabólica (GROSE et al., 2007).

#### 1.5.5.- Fator de transcrição de choque térmico

Os fatores de transcrição de choque térmico (HSFs, sigla em inglês) é uma classe de proteínas estruturais e funcionais que ativam a transcrição de genes (os genes HSP) que codificam proteínas requeridas para o dobramento e o desdobração de outras proteínas, montagem e desmontagem de proteínas em estrutura oligoméricas e a degradação de proteínas que estão montadas impropriamente ou desnaturadas (IGUAL; ESTRUCH, 2000). Em *Saccharomyces cerevisiae* existe apenas um gene HSF, o gene *HSF1* (SORGER, 1991).

Hsf1p está localizado no núcleo, e um nível transcricional constitutivo é necessário para os processos celulares normais. Assim que as células são submetidas a um estresse, o gene *HSF1* torna-se ativo e a expressão de HSP aumenta drasticamente. Logo que as células são retiradas do estresse, a atividade de Hsf1p retorna para o nível basal. As mudanças na atividade de Hsf1p durante o choque térmico envolvem muitos componentes incluindo a hiperfosforilação e as mudanças conformacionais (HASHIKAWA; SAKURAI, 2004; CHEN; PARKER, 2002).

#### 1.5.6.- YAP1

As leveduras quando estão crescendo aerobicamente tem que administrar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês), tais como, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil ou ânion superóxido que são gerados pelos processos metabólicos normais da célula. A resposta ao estresse oxidativo inclui a indução de muitos genes, alguns deles, com conhecidas funções antioxidantes. Yap1p é um fator de transcrição, embora não o único, que tem grande importância na resposta ao estresse oxidativo (IGUAL; ESTRUCH, 2000).

A proteína Yap1p é regulada por localização subcelular. Em condições não estressantes o receptor de exportação, Crm1p, liga-se ao sinal de exportação de Yap1p que se desloca do núcleo para o citoplasma (KUGE et al., 2001). A ligação entre Yap1p e Crm1p é inibida sob estresse oxidativo resultando na localização nuclear de Yap1p (YAN et al., 1998).

#### 1.6.- A alta pressão hidrostática

Altas pressões hidrostáticas caracterizam a maior parte da biosfera quando analisamos os volumes ocupados por terra e água. A pressão pode variar de 0,1 MPa (pressão atmosférica) no nível do mar até 110 MPa no ponto mais profundo dos oceanos localizado a 11.000 m de profundidade, nas fossas Marianas (AERSTEN et al., 2009). Os oceanos possuem uma profundidade média de 3.800 m correspondendo a uma pressão de 38 MPa e ocupam 70% da superfície terrestre.

Um parâmetro físico causador de estresse aos organismos, a pressão está relacionada com efeito de outras fontes de estresse, tais como a temperatura, o etanol e o estresse oxidativo. A alta pressão hidrostática (HHP, sigla em inglês) é um sistema de estresse controlado, acurado e reprodutível que causa mudanças em somente uma variável, a redução do volume (MICHIELS et al., 2008; MENTRÉ; HUI BON HOA, 2001).

O piezotratamento tem ganhado grande importância biotecnológica nas últimas décadas, devido aos estudos de descontaminação e de modulação da atividade de enzimas em alimentos e bebidas, produção de insumos para saúde, como vacinas virais e fármacos, entre outros (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001; AERTSEN et al., 2009).

Mudanças nos valores da alta pressão hidrostática aplicados em células de levedura podem influenciar profundamente seu sistema molecular (FERNANDES, 2005). O aumento da pressão hidrostática causa uma redução da viabilidade celular e, este efeito, torna-se mais evidente quando as células são submetidas a pressões acima de 100 MPa; pressões de 50 MPa não são suficientes para matar ou alterar a

morfologia das células de levedura (FERNANDES et al. 1997). Além disso, a alta pressão hidrostática interfere na arquitetura e na divisão celular, ela também afeta a estrutura da parede celular, a fluidez da membrana e muitas organelas intracelulares (MENTRÉ et al. 1999).

O tratamento com pressão, assim como a limitação nutricional, o feromônio ou outras fontes de estresse, entre elas o choque térmico, causam a parada do ciclo celular na fase G1 (TROTT; MORANO, 2003; PALHANO et al., 2004). Nesta fase, a célula verifica se há condições para que ela prossiga para fase seguinte (fase S) e caso as condições sejam desfavoráveis para a divisão celular, por exemplo, a falta de nutrientes essenciais, as células podem entrar em um estado chamado de latência, conhecido como G0 ou fase estacionária do crescimento (WINDERICKX et al., 2003).

É conhecido que na membrana plasmática, a alta pressão faz com que os ácidos graxos fiquem ordenados mais firmemente, reduzindo a fluidez da membrana e aumentando sua espessura, que interferem nos processos de difusão, comprometem a estrutura e, conseqüentemente, a atividade proteica desta organela (MENTRÉ; HUI BON HOA, 2001). Para compensar este efeito e manter a membrana em um estado funcional líquido-cristalino, a célula deve aumentar a quantidade de ácidos graxos insaturados que constitui a membrana. Ainda, reforçando este fato, já foi demonstrado que em leveduras submetidas ao tratamento de 200 MPa, o gene *OLE1*, uma desaturase de ácido graxo, é induzido (FERNANDES et al., 2004).

A alta pressão afeta também a estrutura da parede celular, porém este efeito é contrabalanceado pela indução do gene *HSP12* (FERNANDES et al., 2004), que codifica uma pequena proteína (12 KDa) hidrofílica, localizada na periferia da parede celular, onde atua interrompendo as pontes de hidrogênio e interações iônicas entre polímeros de polissacarídeos adjacentes, resultando em uma estrutura mais flexível (SALES et al., 2000; MOTSHWENE et al., 2004). Além disso, foi mostrado que a parede celular da levedura é severamente danificada em tratamento com 500 MPa (HARTMANN et al., 2006).

As proteínas também são afetadas pela HHP em valores de pressão acima de 500 MPa. Estes valores causam desnaturação de proteínas, e em valores perto de 200 MPa geram importantes alterações na conformação protéica que podem modificar as reações enzimáticas, assim como, o funcionamento e as interações proteicas (MOLINA-GARCIA, 2002). Outro fato interessante é que, geralmente, a pressão dentro de uma faixa limite, próximo a 200 MPa, causa desnaturação reversível nas proteínas, diferentemente da desnaturação causada pela temperatura (FOGUEL; SILVA, 2004).

Outro efeito causado pela alta pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae* é a acidificação do citoplasma e do vacúolo. Sob pressão atmosférica, o citoplasma e o vacúolo possuem pH constante de 7,0 e 6,0, respectivamente (ABE; HORIKOSHI, 1995). Valores de pressão na faixa 40-60 MPa diminuem o pH citoplasmático em 0,3 unidades e o vacuolar em 0,3-0,5 unidades. Este aumento da acidez é devido à solubilidade do CO<sub>2</sub>, devido à grande dissociação do ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e aos açúcares fermentáveis quando submetidas ao piezotratamento (ABE et al., 1998). Mas, a conservação do pH intracelular é necessária para a viabilidade das células de levedura. Já foi descrito, que existe uma indução do gene *HSP30* em células pressurizadas (FERNANDES et al., 2004), a qual codifica uma proteína que regula negativamente a H<sup>+</sup>-ATPase, demonstrando possuir um importante papel na conservação da energia durante o estresse (SEYMOUR; PIPER, 1999).

#### 1.7.- A resposta à alta pressão hidrostática

Várias vias de sinalização relacionadas com a resposta ao estresse são moduladas pela HHP, que reprime e induz uma variedade de genes e aumenta a síntese de proteínas, que conferem a proteção contra os efeitos deletérios das altas pressões (FERNANDES et al., 2005; FERNANDES, 2008).

Estudos com leveduras submetidas à alta pressão hidrostática de 200 MPa por 30 minutos mostram um perfil em que a maioria dos genes expressos estão envolvidos com a defesa ao estresse e ao metabolismo de carboidratos, enquanto os genes reprimidos estão envolvidos na transcrição, na progressão do ciclo celular e na

síntese de proteínas (FERNANDES et al., 2004). Trabalhos conduzidos com valores baixos de pressão por um longo período (30 MPa por 16 h), demonstraram que os genes expressos durante este tratamento estão envolvidos na síntese de lipídios e no metabolismo de aminoácidos (IWAHASHI et al., 2005).

O piezotratamento também é causador da resposta padrão ao estresse de expressão gênica, a qual é denominada de resposta ao estresse ambiental (ESR, sigla em inglês). Esta resposta está associada a uma forte repressão de genes codificantes para proteínas envolvidas no ciclo celular e síntese proteica e indução de genes com envolvimento em várias funções celulares, como metabolismo de carboidratos, enovelamento de proteínas, defesa contra agentes oxidantes, reparo do DNA, entre outras (WARNER, 1999, GASH et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2011).

Outro estudo que combina a alta pressão hidrostática e em seguida submetida ao frio mostrou que a transcrição de genes conduz um diferente modelo de expressão, entretanto, observou-se características comuns para os dois tratamentos quando estes foram analisados individualmente, demonstrando uma forte indução de proteínas de choque térmico, como por exemplo, *HSP12*, *HSP26* e *HSP30* e, genes envolvidos na degradação proteica, como *UBI4* (IWAHASHI et al., 2003).

Fernandes et al. (2004) verificaram que a pressão hidrostática está sob o controle dos fatores transcricionais, Msn2p e Msn4p, e que 40% dos genes induzidos pelo tratamento com 200 MPa por 30 minutos, apresentaram um ou mais STRE na sua região promotora. Outros trabalhos de microarranjo utilizando a pressão como estresse também demonstraram a indução de genes regulados por Msn2/4p (IWAHASHI et al., 2003; IWAHASHI et al., 2005).

Outro fato reportado que reforça a relação entre a HHP e a regulação por Msn2/4p foi mostrado em um estudo conduzido por Domitrovic e colaboradores (2006) em que linhagens mutantes de *S. cerevisiae* com deleções no fator de transcrição Msn2/4 demonstraram ser mais sensíveis à pressão quando comparadas a linhagem selvagem, e esta sensibilidade pode aumentar dependendo do valor e da duração do tratamento de pressão.

Outra situação interessante, é que a pressão hidrostática também pode induzir a resposta a partir da proteção cruzada. Já foi observado que leveduras pré-tratadas com um estresse suave de temperatura leva a uma proteção da célula contra muitos estresses severos, entre eles, a alta pressão hidrostática (IWAHASHI et al., 1991; FERNANDES et al., 2001). Fernandes et al. (2001) mostraram que as células aumentam a viabilidade em 500 vezes quando são pré-tratadas com calor e, em seguida, submetidas ao estresse por HHP em comparação com as células que somente são submetidas ao piezotratamento.

Outros estresses também oferecem tolerância à alta pressão, Palhao et al. (2004b) descreveram que as células pré-tratadas por estresse brando, induzidos por peróxido de hidrogênio, etanol e frio também podem induzir a piezotolerância. Qualquer mecanismo que induza a transcrição de genes envolvidos com a preservação das membranas celulares, a detoxificação ou o enovelamento proteico mesmo sendo induzidos a partir de diferentes fontes estressantes, pode proteger as células contra os efeitos prejudiciais da alta pressão hidrostática (FERNANDES, 2005).

O tratamento sub-letal com HHP também pode gerar proteção para tratamentos letais como a própria alta pressão e outros estresses, entretanto é necessário um tempo de incubação em pressão ambiente para que as células adquiram a proteção antes de serem expostas aos estresses mais severos. O estudo de Palhao et al. (2004a) mostraram que, quando as células são incubadas pelo menos 15 minutos a pressão atmosférica, seus efeitos de proteção persistem por uma hora quando o estresse posterior é a alta pressão hidrostática ou o tratamento com baixa temperatura, a proteção contra o calor também acontece porém, o período de proteção é mais curto.

### 1.8.- Microarranjo

O microarranjo de DNA é uma poderosa ferramenta que permite analisar o transcriptoma. Esta técnica foi desenvolvida para monitorar a expressão do genoma inteiro em um único experimento. Nela, os transcritos reversos de cDNAs são

marcados com fluorescência e, em seguida, hibridizados com as sondas complementares aos cDNAs presentes no chip do microarranjo. A expressão dos genes são monitoradas pela medição das intensidades de fluorescência do cDNA que foram hibridizados com as correspondentes sondas. Marcações com diferentes fluoróforos entre tratados e controle permitem análises relativas em um único chip.

Este tipo de abordagem pertence à genômica funcional que foca nos aspectos dinâmicos, tais como, a transcrição do gene, a tradução e interações proteínas-proteínas, em oposição aos aspectos estáticos da informação genômica, tais como, sequência de DNA ou estruturas (PEVSNER, 2009). E, devido a grande quantidade de dados produzidos pelas várias técnicas da genômica funcional e o desejo de encontrar padrões biologicamente significativos, a bioinformática torna-se fundamental para a análise destes dados.

Diversos estudos têm demonstrado que a alta pressão hidrostática induz a uma resposta a estresse semelhante a fatores que afetam as membranas e a parede celular (FERNANDES et al., 2004; FERNANDES, 2005; FERNANDES, 2008; PALHANO et al., 2004a; BRAVIM et al., 2010). Observamos também que um tratamento com HHP leva a uma melhor aclimação das leveduras ao ambiente de fermentação, levando a um aumento na produção de etanol, nas primeiras horas do processo fermentativo (BRAVIM, 2011). Conseqüentemente, a HHP é um bom modelo para estudos que visam à compreensão das respostas da levedura aos estresses encontrados nas dornas de fermentação.

Um fator importante para a compreensão dos mecanismos relacionados à tolerância das células aos estresses é a análise temporal da expressão gênica. Observando quais genes são expressos durante o estresse e quais são induzidos após a situação estressante pode-se sugerir a forma como a célula recruta suas proteínas e responde ao ambiente adverso. Desta forma, células da levedura selvagem, BT0605, foram submetidas ao tratamento de pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min; e depois incubadas a pressão ambiente por 5, 10 e 15 min. E, após extração do mRNA, realizamos o experimento de microarranjo. A compreensão das respostas moleculares aos estresses em levedura irá auxiliar na manipulação genética deste microrganismo e, conseqüente aplicação industrial das linhagens.

## 2.- OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos sistêmicos da alta pressão hidrostática na fisiologia da parede celular e membrana da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através da análise de expressão gênica global medida imediatamente após o tratamento de pressão e em diferentes tempos pós-pressão.

### 2.1.- Objetivos específicos

2.1.1.- Identificar os genes diferencialmente expressos após o tratamento de pressão hidrostática;

2.1.2.- Analisar o padrão de expressão temporal dos genes após o estresse por HHP;

2.1.3.- Comparar o estresse por HHP com outros estresses descritos na literatura;

2.1.4.- Agrupar os genes de acordo com suas funções e fatores de transcrição que se relacionam com o comportamento celular;

2.1.5.- Analisar fatores de transcrição que se relacionam com os grupos gênicos diferencialmente expressos;

2.1.6.- Validar os dados obtidos no experimento de microarranjo por PCR em tempo real.

### 3.- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.- Linhagens utilizadas, condições de crescimento e tratamento de pressão

A linhagem selvagem, BT0605, foi crescida a 28°C com agitação (160 rpm) em meio YEPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) até a fase exponencial de crescimento ( $D.O_{600nm}=1,0$ ), antes de ser submetida ao tratamento.

As culturas decélulas foram submetidas a quatro tratamentos de pressão hidrostática: (1) 50 MPa por 30 min; (2) 50 MPa por 30 min + 0,1 MPa por 5 min; (3) 50 MPa por 30 min + 0,1 MPa por 10 min; e (4) 50 MPa por 30 min + 0,1 MPa por 15 min. Uma alíquota não-pressurizada foi utilizada como controle. No procedimento para o tratamento com pressão, as amostras foram colocadas em um tubo de teflon de 4mL e pressurizadas na ausência de ar à temperatura ambiente. O aparato para aplicação de alta pressão hidrostática utilizado neste trabalho foi desenhada para pressurização de amostras em um meio líquido através de um pistão cilíndrico de Cobre-Berílio. Um manômetro manual foi utilizado para medira pressão.

#### 3.2.- Análise de microarranjo

Após os tratamentos com alta pressão, as células foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 3 min. a 5°C, lavadas em água ultrapura e centrifugadas novamente, sendo o precipitado imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -80°C até o momento da extração do RNA.

##### 3.2.1.- Análise do mRNA

As análises de microarranjo foram realizadas no Laboratório Lewis Thomas, do Departamento de Biologia Molecular, na Universidade de Princeton (Princeton, Nova Jersey, EUA), sob orientação do Dr. James R. Broach. As amostras foram pressurizadas e enviadas em gelo seco para os Estados Unidos.

O RNA total foi extraído usando o mini kit RNeasy (Qiagen, Califórnia, EUA), que inclui o tratamento com DNaseI. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer, Delaware, EUA) e diluído para 100 ng/μL em água livre de nuclease.

O cRNA foi sintetizado usando o kit *Low RNA Input Linear Amplification* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) com algumas modificações. Os controles foram ligados com a sonda Cyanina3-CTP (Cy3-CTP) e as amostras tratadas com a sonda Cyanina5-CTP (Cy5-CTP) (PerkinElmer, Massachusetts, EUA). O cRNA amplificado bem como a incorporação das amostras às sondas, Cy3-CTP e Cy5-CTP, foram quantificados usando espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer, Delaware, EUA).

Para o processo de hibridização 400 ng de cada sonda foi incubado a 60°C por 17 horas com 25 μL de 10X controle alvo. O cRNA foi hibridizado na lâmina do *AgilentYeast Gene Expression Microarray* (V1, 4x44K, G2519F).

### 3.2.2.- Normalização dos dados

As placas hibridizadas foram lavadas e escaneadas usando *AgilentMicroarray Scanner* (Agilent Technologies Califórnia, EUA) no canal PMT 100% verde e vermelho e em 10 μm de resolução. As imagens escaneadas foram processadas usando *AgilentFeatureExtraction Software* versão 9.5 com as configurações padrão. Os dados normalizados foram armazenados e analisados na *Princeton UniversityMicroArrayDatabase* (PUMAdb). A normalização para cada arranjo foi determinada pelo filtro de consistência rankeada (*rankconsistencyfilter*) e os *spots* foram selecionados (filtrados) pelo método de normalização do algoritmo LOWESS (*locallyweightedscatterplotsmoothing*). A normalização feita pelo LOWESS aplica um suave ajuste que remove falsas variações na intensidade de fluorescência (ZAMAN et al., 2009).

### 3.2.3.- Implementação computacional

Todos os procedimentos de análises de dados foram implementados na linguagem de programação estatística R project versão 2.12.2 obtidos no site <http://www.r-project.org/> (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Para seleção de grupos funcionais foi utilizado o arquivo de classificação fornecido pelo banco de dados do MIPS *ComprehensiveYeastGenomeDatabase* (CYGD) (disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/>) (GÜLDENER, 2005), esse arquivo integrado com algoritmos feitos no R Project possibilitou a escolha dinâmica de grupos gênicos que se desejava analisar.

#### 3.2.3.1.- Gráficos de expressão

Para a confecção dos gráficos de expressão gênica foi necessário desenvolver um programa que selecionava classes gênicas e em seguida gerava os gráficos com base no valor de expressão de cada gene ou grupo de genes. A Figura 1a apresenta o diagrama de blocos do funcionamento deste programa.

A análise de expressão global dos genes foi feita com as principais categorias funcionais. Lembrando que, em alguns casos, a categorização atribuída pelo MIPS permite que um gene pertença ao mesmo tempo a mais de um grupo funcional.

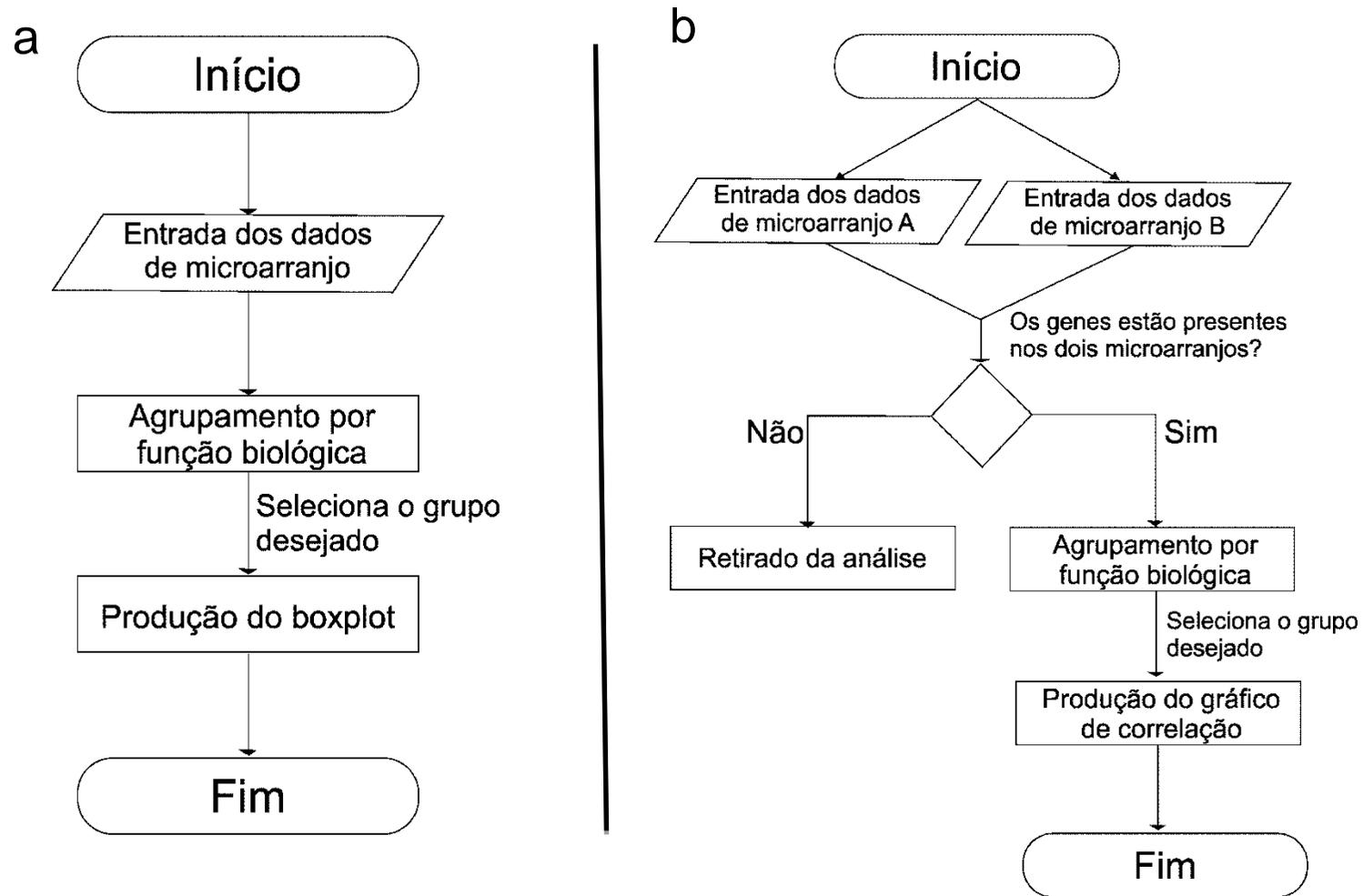
Escolhemos o boxplot (ou diagrama de Box e Whisker) para analisar o perfil de expressão global, por ser uma ferramenta muito utilizada na estatística descritiva e que nos permitiu determinar os genes diferencialmente expressos em função de uma dada classe. Uma das características importante desse tipo de análise é a robustez, que se refere à resistência de uma análise estatística a presença de pontos com comportamento muito diferenciado dos grupos analisado. Além de demonstrar o perfil de cada classe, o boxplot indica quais genes possuem grande discrepância em relação o comportamento geral dentro de uma classe específica (*outliers*), o que fornece um importante ponto de partida para a busca de genes envolvidos no processo de resposta ao piezotratamento.

### 3.2.3.2.- Comparação dos estresses

Para relacionar diferentes tipos de estresse foi necessário desenvolver uma nova rotina computacional. A base de dados deste algoritmo foi a mesma utilizada no software anterior, na qual eram necessários os dados obtidos do MIPS. A Figura 1b mostra o como se dá o funcionamento deste programa.

A tarefa desse software era selecionar uma classe funcional que poderia abranger funções mais gerais ou específicas e apresentar a correlação dessa classe em diferentes tratamentos. Nos gráficos são apresentados a classe selecionada em pontos pretos e os demais genes ao fundo em pontos azuis.

Os dados dos microarranjos para comparação foram obtidos no banco de dados, Gene Expression Omnibus (GEO), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (Barrett et al., 2011). Os genes que possuíam orfs duplicadas ou que possuíam dados corrompidos ou faltantes em qualquer uma das duas análises foram excluídos pelo programa.



**Figura 1-** Diagrama de blocos que apresenta o funcionamento dos programas para produção dos (a) gráfico de expressão e (b) Comparação dos estresses.

### 3.2.3.3.- Construção do mapa quente

Para produção do dendograma ou mapa quente (Figura 2a) foi desenvolvido um programa que estabelecia uma matriz que continha os diferentes dados de microarranjo obtidos no banco de dados GEO e os dados de microarranjo aqui produzidos. O programa exclui todos os genes que estavam duplicados nos dados.

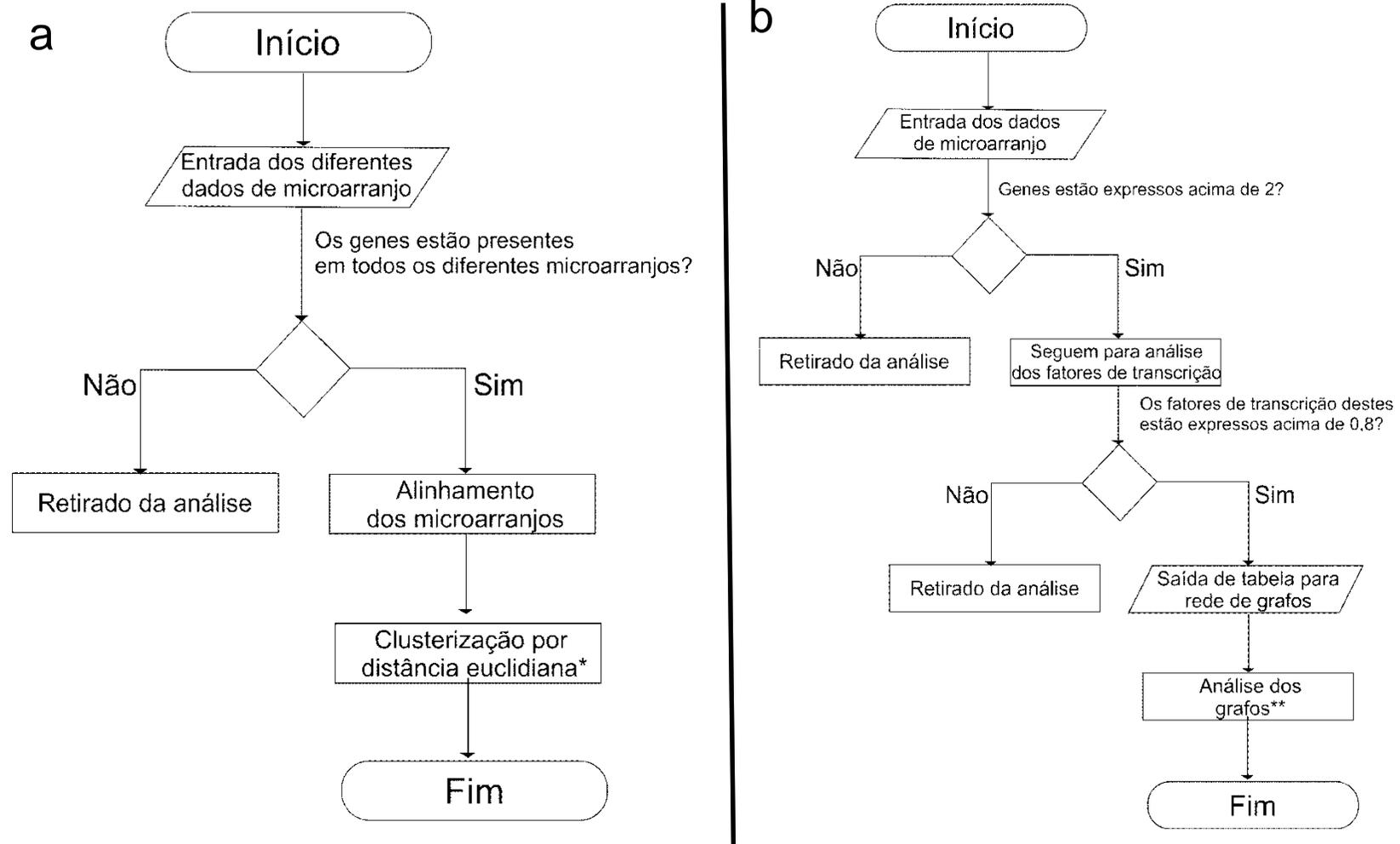
Em seguida foi necessário utilizar o software Cluster versão 3.0 (Eisen et al., 1998) que fez agrupamento hierárquico por distância euclidiana. Para visualizar os resultados obtidos do agrupamento utilizou-se o software TreeView versão 1.1.4r3 (Saldanha, 2004), a representação dos níveis de expressão é dada por cores que variam do verde ao vermelho, na qual a cor vermelha representa valores induzidos, enquanto cores verdes representam genes que têm sua expressão reprimida. Cores cinza representam a falta daquele dado.

### 3.2.3.4.- Análise dos fatores de transcrição

Para análise dos principais fatores de transcrição foi construído um programa que gerava uma lista com os fatores de transcrição que estavam induzidos, acima de 0,8 vezes, e os genes controlados por estes fatores que tinham sua indução igual ou maior que 2 vezes. Os tratamentos utilizados para esta análise foram os dados da célula submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min e o mesmo tratamento seguido de incubação por 15 minutos a pressão ambiente. A figura 2b mostra o racional do programa produzido.

Os dados das interações entre os fatores de transcrição e os genes foram obtidos do banco de dados YEASTRACT, e consideraram-se as interações documentadas por evidências diretas e indiretas (ABDULREHMAN et al., 2011; MONTEIRO et al. 2008; TEIXEIRA et al 2006).

Para visualização e construção das redes de interações utilizou-se o software Cytoscape versão 2.8.2 (SMOOT et al., 2010) o *layout* aplicado foi a força-direta com a opção padrão.



**Figura 2** - Diagrama de blocos que mostra o funcionamento dos programas produzidos (a) para a construção do mapa quente e (b) análise dos fatores de transcrição

### 3.3.- Confirmação dos dados de microarranjo por RT-PCR em tempo real

Para confirmar a indução de alguns genes após o tratamento de pressão hidrostática, foi realizada análise de RT-PCR em tempo real. Os genes escolhidos, bem como a sequência e o tamanho de cada fragmento estão descritos na Tabela 1. O gene *TAF10* foi utilizado como gene de referência (TESTE et al., 2009).

Após os tratamentos com alta pressão, as células foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 3 min a 4°C, lavadas em água ultrapura e centrifugadas novamente, sendo o precipitado imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -80°C até o momento da extração de RNA.

Para a extração, os precipitados congelados, correspondentes às células pressurizadas e não-pressurizadas, foram ressuspensos em tampão AE (50 mM de acetato de sódio, 10 mM de EDTA, pH 5,3) e 10% de SDS. A extração foi feita com fenol/clorofórmio e precipitado com 3 M de acetato de sódio e etanol absoluto. Após a extração, o RNA foi lavado com etanol 70% e ressuspendido com água ultrapura. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer, Delaware, EUA) e armazenadas em freezer a -80°C até serem processadas.

Para a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico, 1 µg de RNA total foi tratado com o kit *DNaseRQ1 RNase-FreeDNase* (PROMEGA, Madison, EUA) durante 30 min a 37°C. Para inativação da enzima, 1 µl de *stop solution* (20mM de EDTA) foi adicionado à amostra e seguiu-se incubação por 10 min à 65°C.

Após tratamento com a DNase, procedeu-se a confecção da fita de cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Para isso, utilizou-se 2 µl de tampão da RT (10x), 0,8 µL de 25x mix de dNTP (100mM), 2 µL de primer randômico (10x) e 1 µL da MultiScribe Reverse Transcriptase, à mistura foi adicionado água para um volume total de 10 µL.

As amostras foram incubadas na seguinte ordem: 10 minutos a 25°C, 37°C por 120 minutos e, posteriormente, 85°C por 5 minutos, e, posteriormente, puderam ser armazenadas em gelo.

Para a reação do PCR em tempo real utilizou-se o equipamento AppliedBiosystemsStepOnePlus™ Real-Time PCR (ABI 6.200, AppliedBiosystems, Califórnia, EUA). O volume total de reação foi de 25 µl contendo: 3,0 µl de cDNA (0,2 µg do RNA tratado com Dnase), 12,5 µl do kit *SYBR Green PCR Master Mix* (AppliedBiosystems, Califórnia, EUA), 1,0 µl de cada primer a uma concentração de 10 µM. As amostras foram submetidas a um ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg 60°C por 1 min, finalizando-se por um ciclo de 95°C por 15 seg. Um controle negativo (contendo todos os reagentes, com exceção de cDNA que foi substituído por água) foi adicionado em todas as corridas.

O número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência deve ultrapassar o limiar (*Cyclethreshold* - Ct), bem como a curva de dissociação (*melting curve*) para a verificação da especificidade da reação, ausência de contaminação e ausência de dímeros de primers foram analisados pelo programa *StepOneSoftware*® (AppliedBiosystems versão 2.1, Califórnia, EUA).

A eficiência de cada par de primer (Anexo 1) foi avaliada pelo método de diluição seriada usando um mix de cDNA como padrão. O valor de eficiência foi calculado pela seguinte fórmula:  $E = [10^{-1/a}]$ , onde *a* é o *slope* entre cada concentração conhecida de cDNA utilizada na curva padrão (primer com eficiência de 100% apresentam *slope* de -3,32). Valores de eficiência entre 80 e 110% foram considerados, utilizando-se a seguinte fórmula para o cálculo da expressão relativa,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde  $\Delta\Delta CT = [(CT_{Tratado} - CT_{Controle}) - (CT_{Tratado-Referência} - CT_{Controle-Referência})]$ .

**Tabela 1-** Oligonucleotídeos utilizados como *primers* na reação de RT-PCR em tempo real

Gene	Sequência do primer	Tamanho do amplicon (pb)	Eficiência do primer (%)
<i>ADH1</i>	Forward, 5'ACTACGCCGGTATCAAATGG3'	138	89.6
	Reverse, 5'TCAGCGGTAGCGTATTGTTG3'		
<i>ADH3</i>	Forward, 5'TATTCAAGCCGCCAAAATTC3'	185	90.7
	Reverse, 5'TAACCCATCGCAGTTGCATA3'		
<i>HSP26</i>	Forward, 5'ATGCTGGCGCTCTTTATGAT3'	95	98.0
	Reverse, 5'TTCTAGGGAAACCGAAACCA3'		
<i>PHM7</i>	Forward, 5'TTGGGGAATTGAACGAAGAG3'	180	88.5
	Reverse, 5'TCTTCTGGCGAGTAGCCAAT3'		
<i>ROM1</i>	Forward, 5'AAACAAGTGGCACCAACACA3'	166	93.4
	Reverse, 5'CATTCTTGGGATTGCTCGTT3'		
<i>RTN2</i>	Forward, 5'CGTGCTATCGACAGGATGAA3'	110	106.7
	Reverse, 5'GGTTTGGGGTGGGATAATCT3'		
<i>TAF10</i>	Forward, 5'GCTAGGCAGCTATTGCAAGG3'	129	98.4
	Reverse, 5'CAACAGCGCTACTGAGATCG3'		
<i>USV1</i>	Forward, 5'AACGACAGCAACAACACCAA3'	214	80.7
	Reverse, 5'CGGAGGAAAGGACGATATGA3'		
<i>YGP1</i>	Forward, 5'TGACGGTGGTTACTCTTCCA3'	49	87.3
	Reverse, 5'GAACGGCAGAACTCAAGGAG3'		
<i>YPS6</i>	Forward, 5'TGGGAGATGCTTTCCTTGTC3'	193	91.7
	Reverse, 5'TCCTGTTCCGATGGGACTAC3'		
<i>ZEO1</i>	Forward, 5'GCCCAAGATGTCCAACAAA3'	167	89.4
	Reverse, 5'TTCGACACCATCAGCAATGT3'		

## 4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.- Análise da expressão de genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática

Este trabalho utilizou a análise de expressão gênica por microarranjo para avaliar o comportamento dos genes relacionados com a parede celular e membrana plasmática. Utilizou-se o banco de dados MIPS (GÜLDENER et al., 2005) para construir os grupos segundo as categorias funcionais, sendo elas metabolismo de polissacarídeos, metabolismo de lipídeos, ácido graxos e isoprenóides, biogênese dos componentes da parede celular e biogênese da membrana plasmática de eucariotos, e de localização, sendo elas parede celular, membrana plasmática e membrana integral e endomembranares (que não são específicas a uma única membrana).

Para as primeiras análises foi utilizado boxplot para avaliar qual o comportamento populacional dos genes, este tipo de gráfico é muito usado quando se quer mostrar as diferenças entre as populações, sem fazer qualquer suposição da distribuição estatística subjacente. Ele também é interessante para analisar quais genes se comportam de modo diferente do restante do grupo, que são referidos como *outlier*. Para construir estes gráficos foi necessário desenvolver um programa na plataforma R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) em que são selecionados os genes dos grupos avaliados e gerados os gráficos.

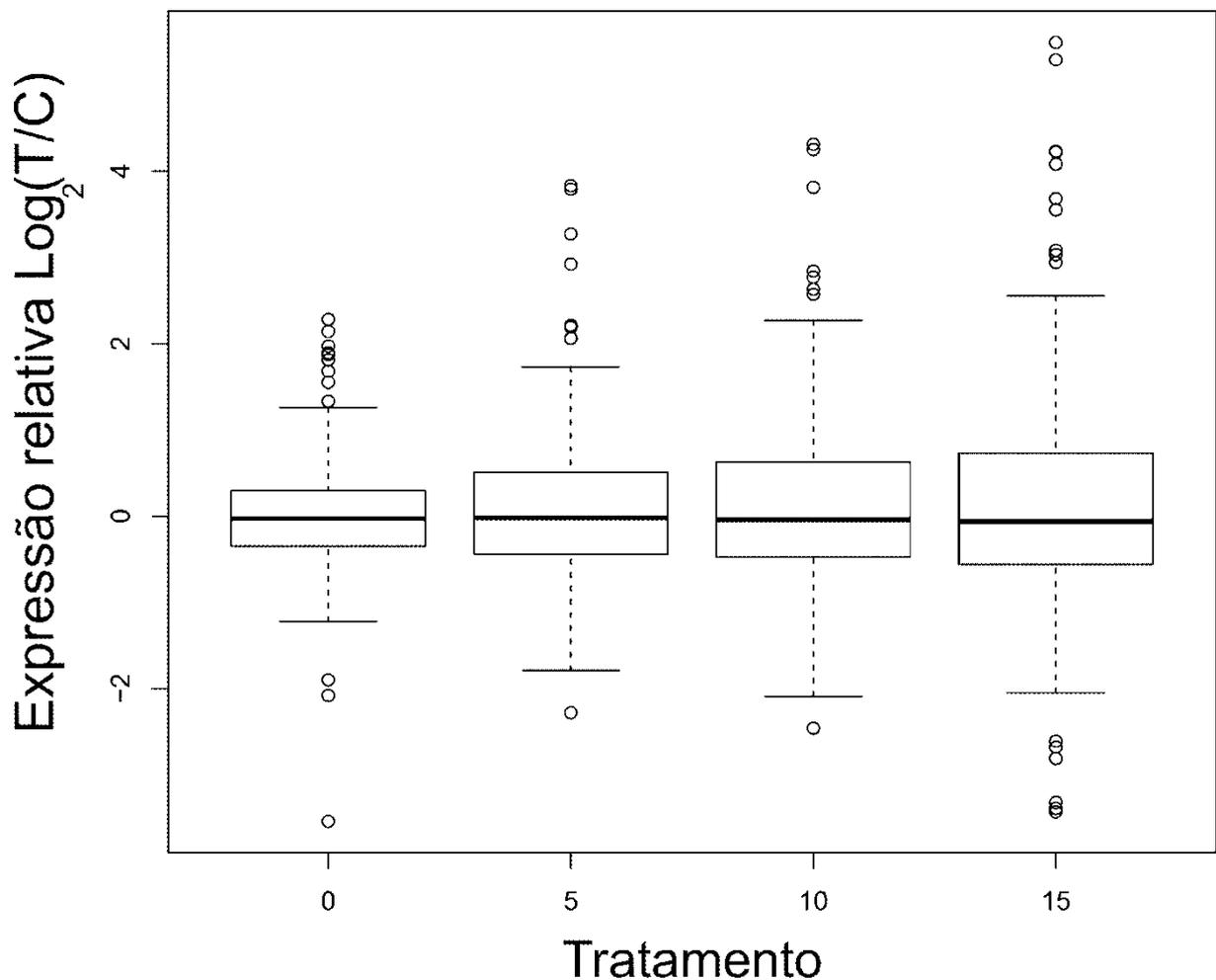
As figuras 1,3,4,5,6 e 7 mostram que com o passar do tempo,depois de aplicado o estresse por HHP, existe um aumento da variação na expressão dos genes, acompanhado do aumento no número de genes afetados pela alta pressão. Fato semelhante, já foi demonstrado por Palhanoet al (2004a)em ensaios de taxa de gemulação de *S. cerevisiae*, as quais necessitam de pelo menos duas horas para que as células retornem seu crescimento normal, mostrando que os efeitos da HHP permanecem por algum tempo depois das células terem sido retiradas do piezotratamento.

#### 4.1.1.- Análise dos genes relacionados à biogênese dos componentes da parede celular

A figura 1 mostra o comportamento dos genes relacionados à biogênese da parede celular. Nela podem-se verificar os genes superexpressos que se diferenciam do grupo (*outliers*) entre os quais podemos destacar os que codificam: *STF2*, que atua na regulação da sintetase mitocondrial F1F0-ATP; *ROM1*, proteína trocadora GDP/GTP para Rho1p; *SDP1*, fosfatase dual-específica que regula negativamente *Stt2p*; *ECM38*, principal enzima degradadora de glutatona; *CSR2*, proteína nuclear proposta como reguladora da endocitose de proteínas da membrana plasmática; *FMP45*, proteína requerida para esporulação e para manutenção do conteúdo de esfingolípídios; *PIR3*, proteína requerida para estabilidade da parede celular; e *CWP1*, manoproteína da parede celular. Os valores de expressão destes genes são mostrados na Anexo 1.

Quando há uma diminuição na força motriz de prótons ou a presença de um desacoplador da fosforilação oxidativa, ocorre uma inversão da ATPase, que passa a hidrolisar o ATP em ADP e Pi (DIENHART et al., 2002). O gene *STF2* tem a função estabilizante que aumenta a ação inibitória da proteína *Inh1p*, que por sua vez age inibindo a hidrólise do ATP pela F1F0-ATP sintase fazendo com que a parede seja afetada indiretamente pela falta de ATP. Já foi demonstrado em outros trabalhos que a pressão hidrostática tem forte atuação sobre a expressão do gene *STF2* (FERNANDES et al., 2004; ABE, 2007; BRAVIM, 2011).

Outros estresses também atuam na ativação deste gene, tais como estresse por calor (GASCH et al., 2000) e etanol (ALEXANDRE et al., 2001). Este último conhecido por aumentar a permeabilidade da membrana, acidificação do meio intracelular pelo aumento da entrada de prótons (ROSA; SÁ-CORREIA, 1991). O tratamento com alta pressão também promove a relativa acidificação citoplasmática que, conseqüentemente, prejudica a atividade da fosfofrutoquinase, enzima que não suporta pequenas variações no pH. Outros trabalhos (ABE; HORIKOSHI, 1998; ABE, 2008) mostraram que a pressão também influencia no decréscimo do pH vacuolar entre 0,3 e 0,5 unidades.



**Figura 3**– Expressão relativa dos 204 genes relacionados à biogênese dos componentes da parede celular medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

A regulação de respostas adaptativas a estresse da parede celular é, principalmente, mediada pela via de integridade celular (LEVIN, 2005). Esta via consiste em uma cascata de fosforilação iniciada com a ativação de Pkc1p, vários estresses estão relacionados com a ativação desta via, tais como o estresse por calor (MARTIN et al., 1999), estresse hiposmótico (DAVENPORT et al., 1995) e agentes causadores de estresse na parede celular (KETELA et al., 1999). Dois genes, relacionados a esta via, apresentaram um aumento em sua expressão no tratamento com pressão, *ROM1* e *SDP1*, o primeiro envolvido na ativação da via por trocar o GDP por GTP em Rho1p, uma enzima ativadora da via de PKC, e o segundo

está envolvido na inativação da via por desfosforilação direta de Slt2p, uma quinase envolvida na regulação desta via. Outros trabalhos também demonstraram que a alta pressão hidrostática também causa um aumento na expressão desses genes (BRAVIM, 2011; IWAHASHI et al., 2003), entretanto a relação entre alta pressão hidrostática e a regulação da via de integridade celular ainda não está clara.

Além disso, trabalhos com alta pressão hidrostática já demonstraram que a resposta transcricional é desencadeada pela expressão dos genes *MSN2/4* (DOMITROVIC et al., 2006), relacionados às vias de sinalização de resposta à alta osmolaridade e resposta geral ao estresse. Estudo com estresse por zimolase, um composto que degrada as redes de  $\beta$ -1,3 glucano da parede celular, já demonstrou que as vias de integridade de parede e de resposta a alta osmolaridade cooperam para responder a este estresse de parede celular (GARCÍA et al., 2009), as quais ativam uma gama de genes comuns com a HHP. O tratamento com pressão poderia também ter um mecanismo parecido, já que ativa genes relacionados com as duas vias, contudo, mais estudos são necessários para verificar de fato qual a relação da HHP com a via de integridade de parede e, se realmente, há essa relação entre as duas vias.

Espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês) são geradas endogenamente, através da fosforilação oxidativa e atividades enzimáticas, ou exogenamente, por fatores ambientais, resultando em reações de oxidação em cadeia que danificam as estruturas celulares, além de impedir as atividades enzimáticas adequadas por causar perturbações no potencial redox interno da célula (SCANDALIOS, 1997). E, provavelmente, para manter a maquinaria celular funcionando, ocorre a indução de genes relacionados a esta resposta em diversos estresses ambientais (SCANDALIOS, 1997). Detectado por testes em larga escala, *ECM38* tem relação direta com a resposta ao estresse oxidativo e indireta com a biogênese da parede celular, já que na ausência da *ECM38* a célula pode transcrever ou traduzir incorretamente a maquinaria necessária para a biossíntese de todos os compostos existentes na parede celular (LUSSIER et al., 1997). A indução de *ECM38* reforça observações sugeridas por Fernandes et al., 2004; Iwahashi et al., 2005; Bravim, 2011, que HHP também pode estar causando estresse oxidativo na célula de *S. cerevisiae*.

Na levedura, muitos transportadores de membrana são endocitados em resposta ao excesso de nutrientes ou em condições estressantes para serem degradados nos vacúolos (NIKKO; PELHAM, 2009). O gene *CSR2* codifica uma proteína pertencente a classe designada de proteína do tipo arrestina (*arrestin-like proteins*, do inglês), que é responsável pela maior parte da degradação de Hxt6p sob condições de estresses (NIKKO; PELHAM, 2009). Este gene tem a indução relacionada a outros estresse, tais como, os estresse relacionados a fermentação de vinho (MARKS et al., 2008) e ao pH alcalino (KURANDA et al., 2006).

Já foi demonstrado pelo grupo que a HHP tem grande influência sobre o metabolismo de carboidratos, evidenciado pela variedade de genes induzidos que são relacionados a esta função e, que conseqüentemente, conduziria a um aumento na produção de etanol (BRAVIM, 2011). A expressão induzida do gene *CSR2*, em todos os tempos testados, mostra um controle diferenciado da entrada de glicose nesta linhagem quando submetida ao tratamento com pressão, entretanto são necessários mais experimentos para demonstrar qual a real relação deste gene com este estresse, já que para que Csr2p seja ativada é necessário que ela seja ubiquitinada pela enzima Rsp5p, cujo gene no tratamento de pressão apresenta-se em níveis basais em todos os tempos analisados.

O gene *FMP45*, que foi induzido a partir de 5 minutos após a pressão, codifica uma proteína integral de membrana, a qual estudos mostram que ela pertence à família de proteínas de membrana, Sur7p, que são relacionadas com a formação de esporo e com o conteúdo de esfingolípídeos da membrana plasmática (YOUNG et al., 2002). Além disso, Tarassov et al. (2008) mostrou que Fmp45p revela interação com Gpx2p, que é envolvida na defesa contra estresse oxidativo. Outros estudos com tratamento de alta pressão, também mostraram a indução de *FMP45* (FERNANDES et al., 2004; IWAHASHI et al., 2003, BRAVIM, 2011) revelando que, o conteúdo proteico da membrana plasmática também parece ser sensível ao piezotratamento.

O tratamento por alta pressão hidrostática também induz a expressão de *PIR3*, proteína glicosilada que é um componente estrutural da parede celular da levedura, com envolvimento direto no remodelamento da parede celular (ARROYO et al., 2009). Além disso esta proteína é requerida tanto na tolerância ao calor quanto a

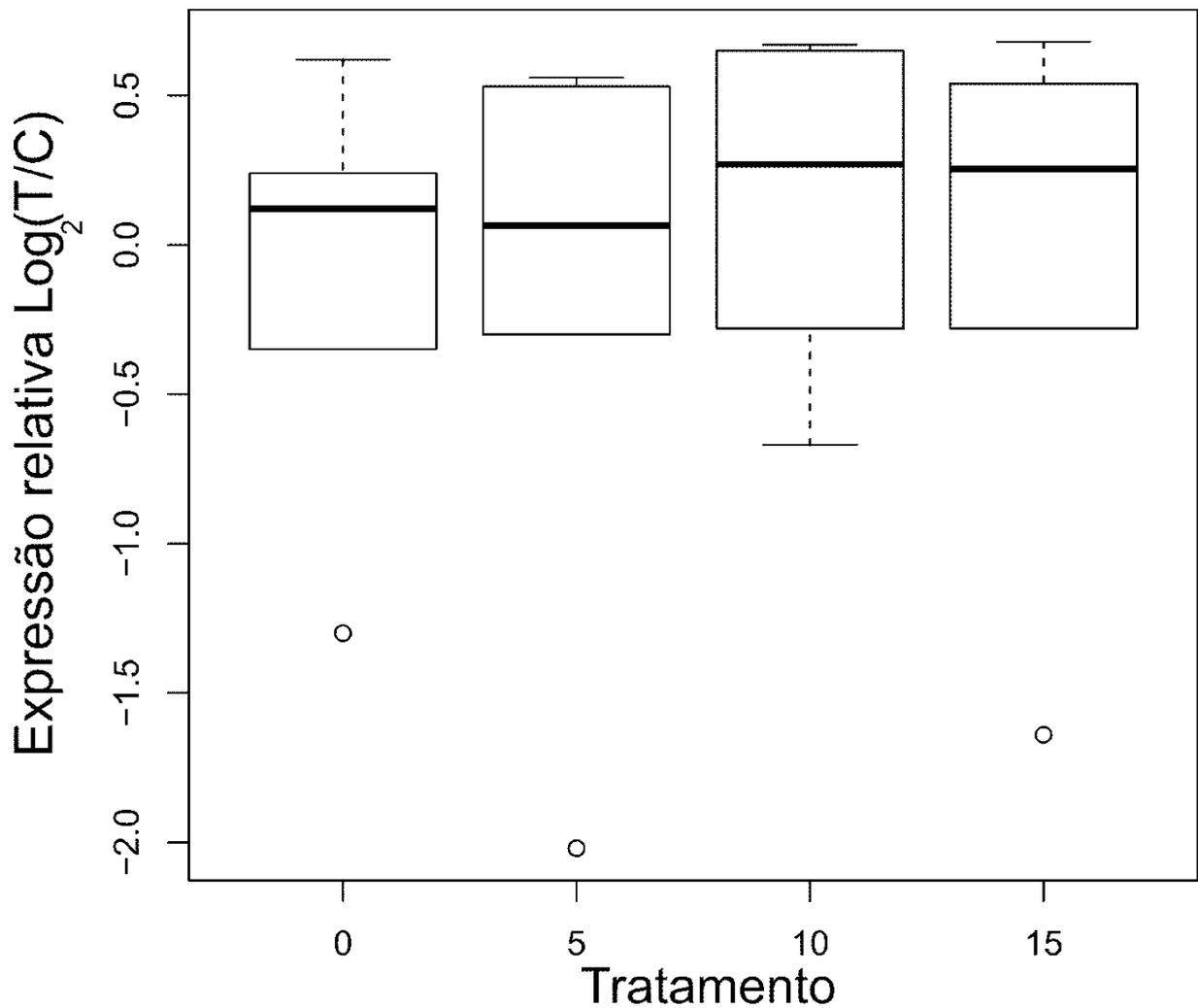
osmotina, um antifúngico que altera o potencial e permeabilidade da membrana plasmática (GASCH et al., 2000; YUN et al., 1997; TOH-E et al., 1993). Outros estudos, utilizando a HHP, também demonstraram a indução deste gene (IWAHASHI et al., 2003, BRAVIM, 2011), entretanto no estudo conduzido por Iwahashiet al. (2003), em que as células são submetidas por 16 h ao estresse de pressão, foi observado uma maior quantidade de genes induzidos relacionados ao remodelamento da parede, mostrando que a indução dos genes de parede podem estar relacionados ao período que a célula é submetida a condição estressante.

As manoproteínas compreendem 40% da massa da parede celular. São extensivamente O- e N-glicosiladas (KLIS et al., 2006) e parecem desempenhar um importante papel na permeabilidade da parede celular (DE NOBEL et al., 1990; ZLOTNIK et al., 1984). O gene *CWP1* codifica uma das maiores manoproteínas do exterior da célula e sua deleção causa um aumento na sensibilidade por alguns compostos químicos (DIELBANDHOESING et al., 1998; VAN DER VAART et al., 1995). Este gene é encontrado induzido quando as células de levedura são submetidas a 40 MPa por 16 horas (IWAHASHI et al., 2003), entretanto sua indução parece estar relacionada também ao tempo em que a célula encontra-se fora do estresse, ocorrendo um aumento de 10 vezes entre a expressão nos tratamentos imediatamente com 15 minutos após o estresse.

O comportamento dos genes induzidos pela alta pressão hidrostática, relacionados à biogênese da parede celular, mostra que este estresse induz primeiramente os genes relacionados com a proteção, de forma direta ou indireta, desta organela; enquanto os genes que são estruturalmente envolvidos com a parede celular necessitam de pelo menos 5 minutos à pressão ambiente para serem induzidos.

#### 4.1.2.- Análise dos genes relacionados à biogênese da membrana plasmática

A análise do grupo de genes responsáveis pela biogênese da membrana plasmática não demonstrou nenhum gene com alta indução que o diferenciava dos grupos analisados (Figura 2). O perfil de expressão dos genes relacionados à membrana plasmática não apresentou nenhum gene diferencialmente induzido nos tempos testados entre os grupos tratados e os controles.

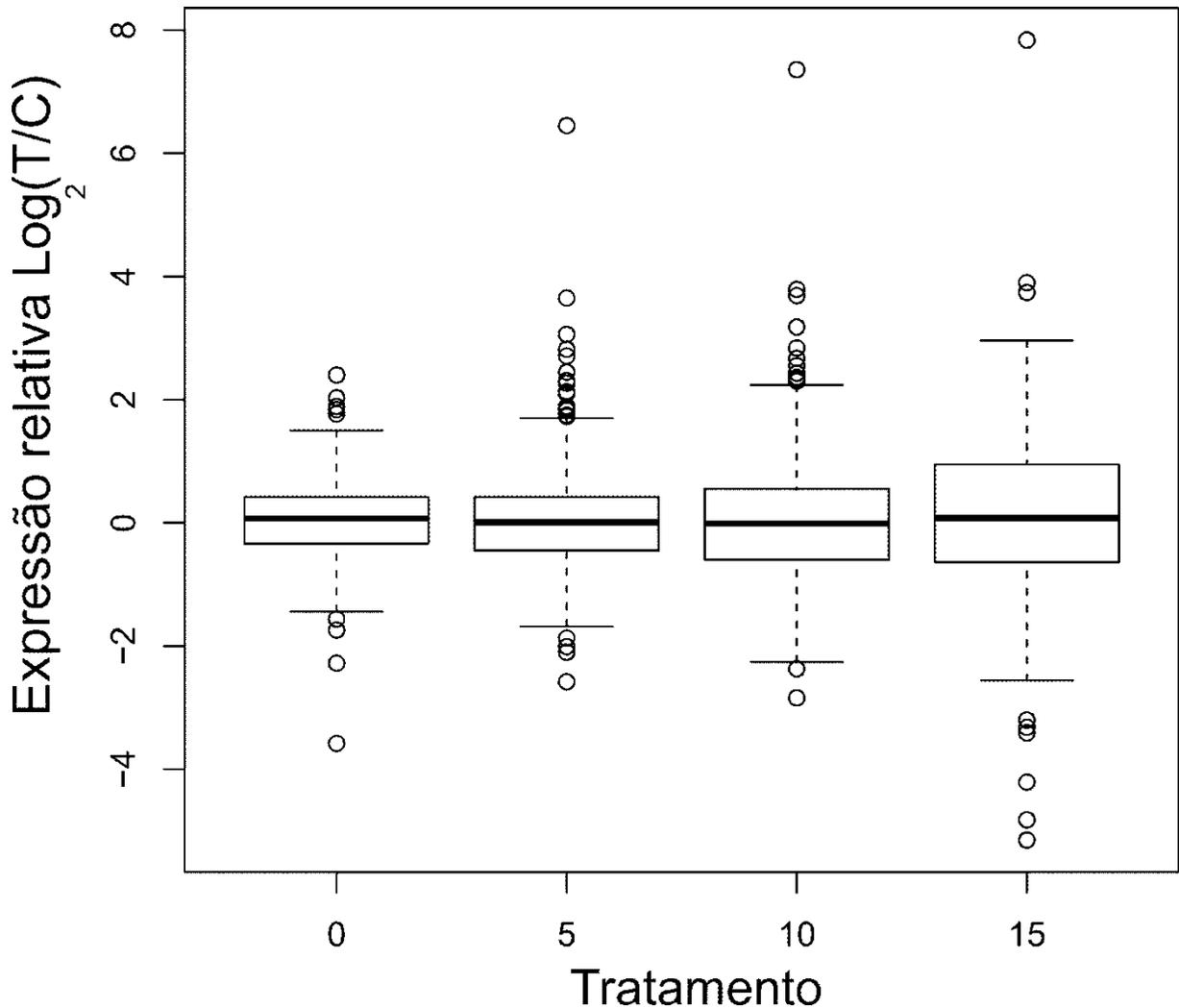


**Figura 4** - Expressão relativa dos 6 genes relacionados à pela biogênese da membrana plasmática medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

#### 4.1.3.- Análise dos genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides

Sobre os genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides foram encontrados os seguintes genes superexpressos que se diferenciam do grupo (Figura 3): *YPC1*, que catalisa tanto a degradação quanto a síntese de fitoceramida; *GPD1*, enzima chave para síntese de glicerol; *GUT2* envolvido na utilização de glicerol; *GPT2*, envolvido na acilação de glicerol-3-fosfato e diidroxiacetona biossíntese de lipídeos; e *HSP12*, proteína envolvida na

manutenção da membrana em condições de estresse. A Anexo 1 apresenta os valores de expressão destes genes.



**Figura 5-** Expressão relativa dos 283 genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

O gene *YPC1* é responsável por codificar uma ceremidase alcalina. Ceremidasas são intermediários na via de biossíntese dos esfingolipídios e tem-se demonstrado que em mamíferos está relacionada com a apoptose e à resposta ao estresse. Na presença de fumonisina B1, uma micotoxina e inibidor da síntese de ceramida, Ypc1p tem uma atividade reversa de acil-CoA independente que resulta na produção de ceramida e, portanto, pode funcionar como uma ceramidasintase. Esta atividade

dupla de Ypc1p sugere uma possível via de reciclagem para síntese de ceramida nas leveduras (SCHORLING et al., 2001; MAO et al., 2000a; MAO et al., 2000b).

Já foi demonstrado em outros trabalhos a indução do gene *YPC1* pelo tratamento de pressão (FERNANDES et al., 2004, BRAVIM, 2011). Mesmo em valores de pressão diferentes observa-se a indução de *YPC1*, que reforça o fato de que o efeito da HHP sobre a membrana é devido à sensibilidade dos lipídeos (WEBER; DRICKAMER, 1983).

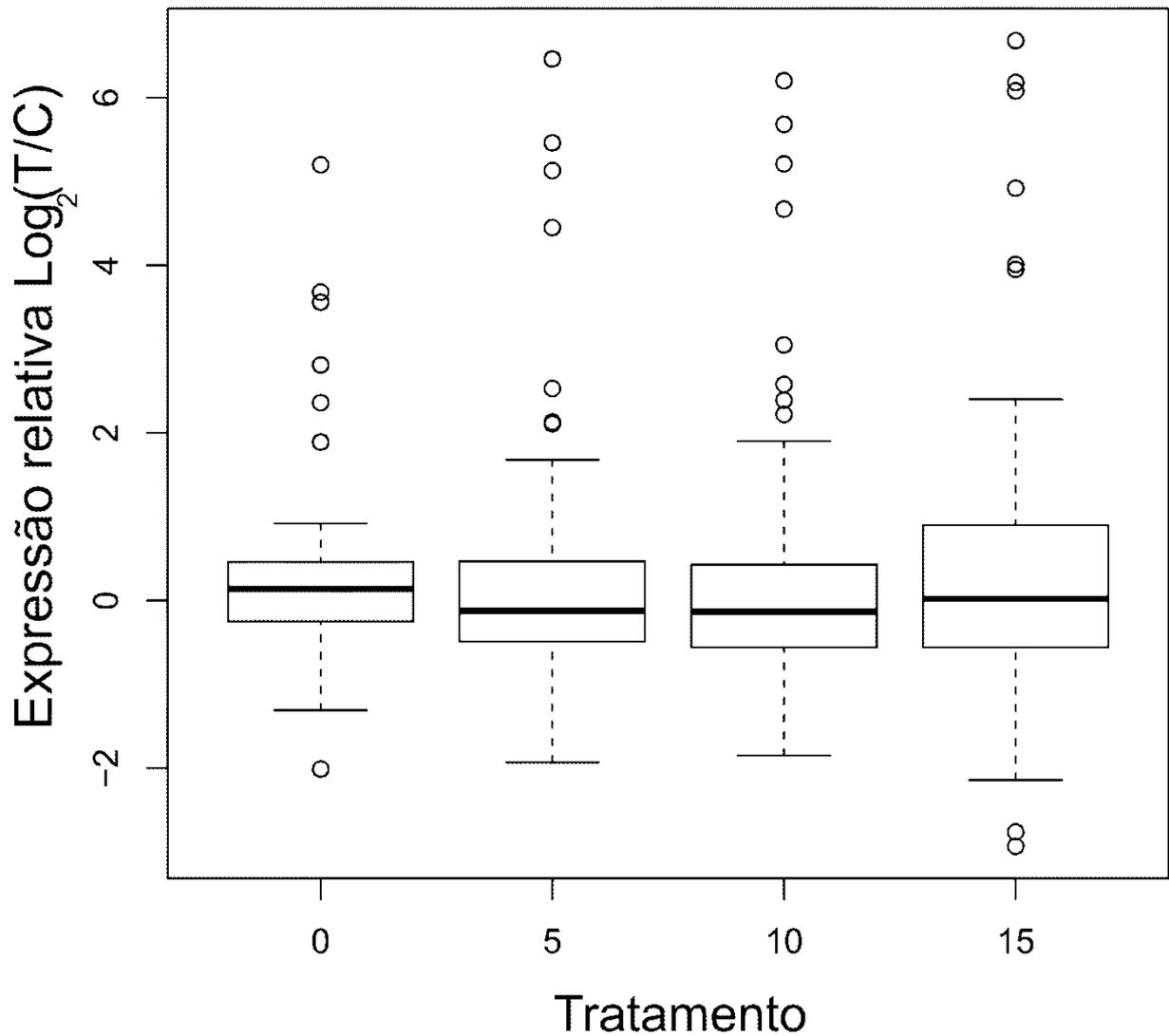
Dois genes envolvidos com a síntese de lipídeos a partir do glicerol tem a expressão induzida pela HHP. *GDP1*, que codifica a enzima glicerol -3-fosfato- desidrogenase, responsável pela redução de diidroxicetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato e *GPT2*, que codifica a glicerol-3-fosfato aciltransferase responsável por catalisar a reação do acilCoA e glicerol-3-fosfato para produzir ácido lisofosfatídico precursor imediato do ácido fosfatídico (Zheng; Zou 2001).

Sabe-se que a síntese de glicerol está fortemente associada com a proteção contra estresse osmótico sendo responsável tanto pelo controle da osmoregulação, quanto pelo controle do balanço redox na célula, reciclando  $\text{NAD}^+$  em condições anaeróbicas (JOHANNES et al., 1986), além disso, estudos com o tratamento de pressão hidrostática têm demonstrado que o estresse osmótico está associado a produção de etanol após o piezotratamento (BRAVIM, 2011). Aqui, se verifica também que parte desse glicerol poderia ser desviado para produção de lipídeos após o estresse pela indução de *GPT2*.

Assim como em outros estresses, o tratamento com alta pressão é um indutor muito conhecido de uma variedade de genes que codificam as chaperonas (FERNANDES et al., 2004, IWAHASHI et al., 2003, BRAVIM, 2011). Neste trabalho, a expressão da *HSP12* é notada nos tempos 5, 10 e 15 minutos após o estresse. É conhecido, que estresses que causam danos severos à membrana plasmática, tais como estresse por etanol e osmótico, estão relacionados com a indução de *HSP12* (YALE; BOHNER, 2001; SAHARA et al., 2002).

Welker et al.(2010) mostraram que a Hsp12p tem uma função protetora na morfologia da célula e pode estabilizar a membrana, atuando na mudança de sua

fluidez. Já foi mostrado que a alta pressão hidrostática altera intensamente a estrutura da membrana (FERNANDES et al., 2001) e a indução das HSPs, principalmente *HSP12*, estando relacionada à desestabilização da membrana pelo tratamento com HHP (FERNANDES et al., 2004).



**Figura 6-** Expressão relativa dos 62 genes relacionados ao metabolismo de polissacarídeos medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

#### 4.1.4.- Análise dos genes relacionados ao metabolismo de polissacarídeos de parede celular

A Figura 4 demonstra o comportamento dos genes relacionados ao metabolismo de polissacarídeos. Somente um gene relacionado aos polissacarídeos de parede celular está superexpresso, o *SHC1*, que é requerido para síntese de quitosano. O valor de expressão deste gene é mostrado na Anexo 1.

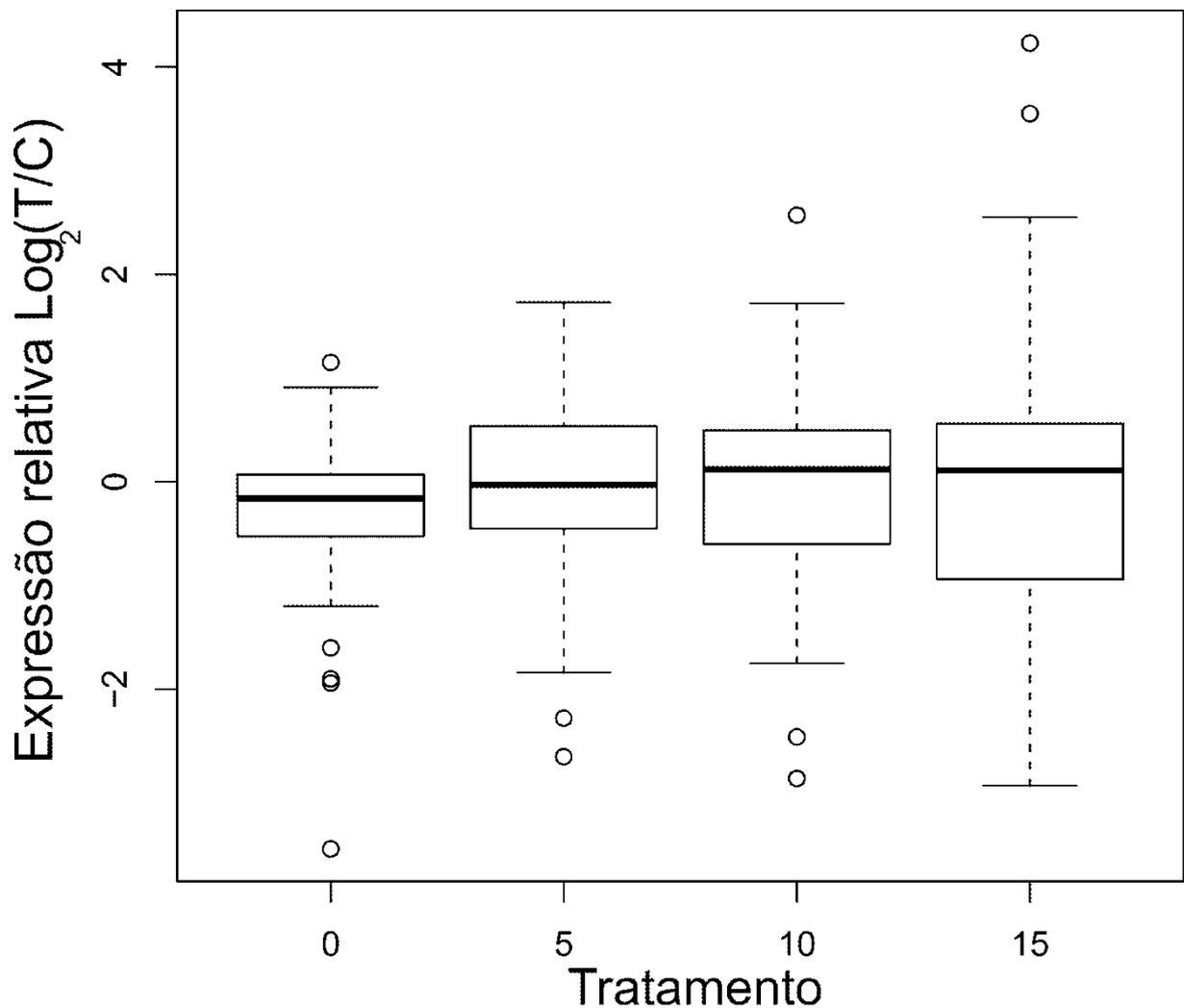
*SHC1* é um gene induzido durante a esporulação, necessário para síntese de ascósporo (SANZ et al., 2002). Um aumento na expressão deste gene já foi descrito em células crescidas em pH alcalino (Hong et al., 1999). Neste trabalho, o estresse por HHP fez com que este gene fosse induzido logo após a pressão e também 5 e 10 minutos depois de aplicado o estresse. Outros trabalhos com diferentes valores de pressão não demonstraram este mesmo resultado (FERNANDES et al., 2004, IWAHASHI et al., 2003).

Os demais genes superexpressos estão relacionados ao metabolismo de outros polissacarídeos, tais como glicogênio.

#### 4.1.5.- Análise dos genes localizados na parede celular

Apenas poucos genes que codificam proteínas localizadas na parede celular foram induzidos após os tratamentos de pressão (Figura 5). São eles, *OSW2*, uma proteína com função desconhecida que pode estar relacionada com a montagem da parede celular do esporo; *PIR3* e *CWP1*, dois genes já mencionados. Os valores de expressão destes genes são mostrados na Anexo 1.

*OSW2* é um gene requerido para os últimos passos na síntese da parede do esporo, talvez na conclusão da camada de ditirosina (COLUCCIO et al., 2004). Assim como na indução do gene *SCH1*, *OSW2* também foi induzido nos tempos 0, 5 e 10 min seguido de um decaimento em sua expressão 15 minutos após o estresse. A indução destes dois genes no estresse, nos primeiros instantes após a perturbação poderia estar envolvida com uma tentativa da célula esporular, entretanto mais estudos são necessários para comprovar este fato.

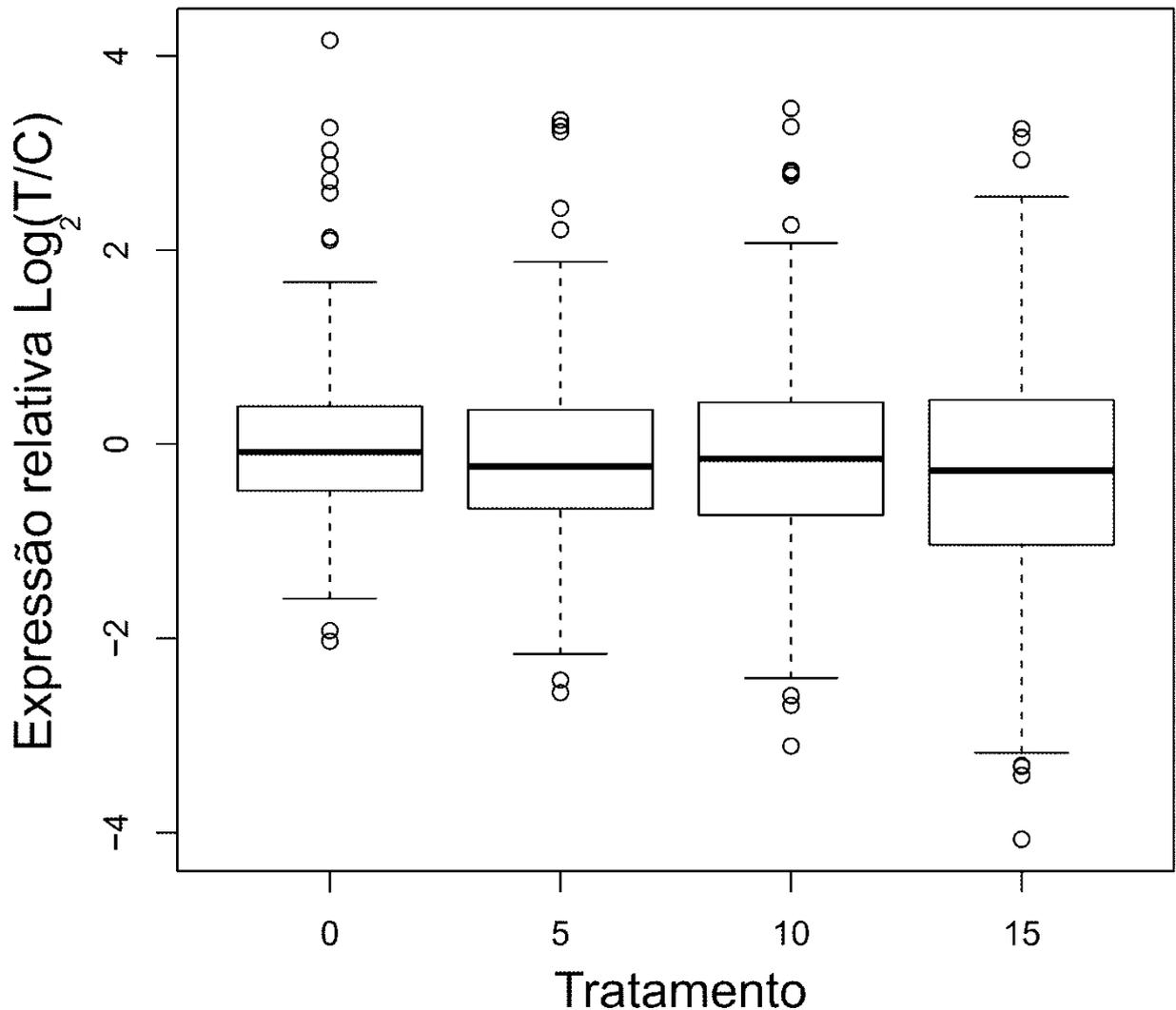


**Figura 7-** Expressão relativa dos 43 genes localizados na parede celular medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

#### 4.1.6.- Análise dos genes localizados na membrana plasmática

A figura 6 mostra o perfil de expressão dos genes que codificam proteínas localizadas especificamente na membrana plasmática, dentre eles, pode-se destacar os genes *PDR11*, envolvido na captação de esterol; *TPK2*, que codifica a isoforma da subunidade catalítica de PKA; *HSP30*, uma chaperona da família das proteínas de choque térmico; *RAS2*, uma proteína ligante de GTP; e *PST1*, uma proteína que

contém um sítio de ancoragem a GPI. Os valores de expressão destes genes são mostrados na Anexo 1.



**Figura 8-** Expressão relativa dos 172 genes localizados na membrana plasmática medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

O gene *PDR11* é requerido para o crescimento anaeróbico e está envolvido na captação de esterol quando as outras proteínas que exercem essa função estão

comprometidas (WILCOX et al., 2002). No estresse por alta pressão hidrostática, este gene se mostra induzido imediatamente após o tratamento, isto pode estar relacionado à adaptação da célula ao estresse. Já foi relatado, que a adição de ergosterol, induz a tolerância ao estresse térmico e etanol, estes estresses são conhecidos por causarem danos à membrana plasmática em linhagens esterol-auxotrófico (SWAN; WATSON, 1998).

Sabe-se que a via de RAS/PKA tem um papel central na resposta a mudanças na concentração de glicose e iniciação dos processos de sinalização que levam ao crescimento celular e divisão (SANTANGELO, 2006; WANG et al., 2004; BROACH; DESCHENES, 1990). Através da fosforilação de vários alvos, a PKA regula os processos envolvidos no crescimento celular, na resposta a nutrientes e outros estresses, entre eles, o estresse por choque osmótico e térmico (ESTRUCH, 2000). E tanto *RAS2* quanto *TPK2* são dois importantes componente dessa via de sinalização.

*RAS2* codifica um homólogo do oncogene RAS de mamíferos e é altamente relacionado com o gene *RAS1* das leveduras (BROEK et al., 1985). Ras2p regula processos como a esporulação, crescimento filamentosos e a resposta à privação de nitrogênio através de seus efeitos sobre a adenilatociclase (BROEK et al., 1985). E *TPK2*, que codifica uma isoforma da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (PKA, sigla em inglês), a quinase efetora da via de sinalização RAS-cAMP (SANTANGELO, 2006; BROACH, 1991).

Já é conhecido que a baixa atividade da PKA está relacionada com vários fatores, entre eles, a resposta das células ao estresse, desreprimindo os genes que contém os elementos STRE. Entretanto, já foi relatado que pode haver uma possível cooperação entre a resposta ao estresse por baixas temperaturas e a via de sinalização da PKA, a qual induz muitos genes desta via, sendo o aumento da fluidez da membrana o agente que causaria a possível mudança do estado fosforilado dos componentes da via de sinalização de cAMP-PKA e consequentemente a ativação (SAHARA et al., 2002). Nosso trabalho demonstrou um aumento de *RAS2* 5 minutos após o tratamento e a indução de *TPK2* em todos os tratamentos, isso demonstra

que o mecanismo de resposta à alta pressão hidrostática também pode estar relacionado com esta via de sinalização.

Outro gene da família das HSPs, *HSP30* também se mostrou induzido, pelo tratamento de HHP. A indução deste gene já foi demonstrada após diferentes tipos de estresse, inclusive após o piezotratamento. Fernandes et al. (2004) observaram em seu estudo que os genes *HSP12* e *HSP30* sofrem forte indução após estresse de 200 MPa por 30 minutos.

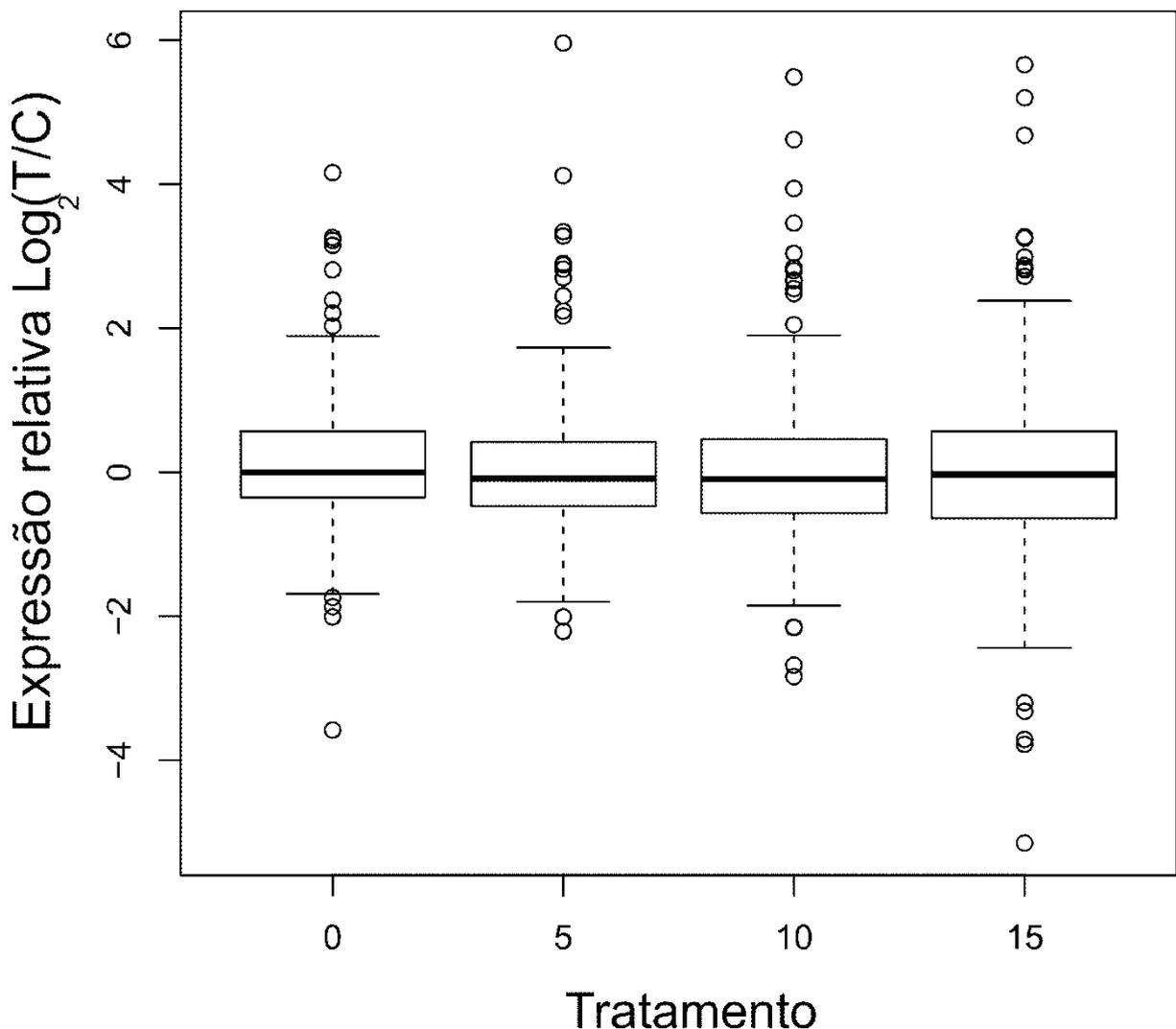
O gene *PST1* codifica uma proteína de parede celular que contém um sítio de ancoragem-GPI, sendo secretadas para regenerar protoplastos; sua indução está relacionada à via de integridade celular, mediada por Rlm1p, e também induzido em resposta ao dano da parede celular por meio do rompimento de *FKS1* (HAMADA et al., 1999; JUNG; LEVIN, 1999; TERASHIMA et al., 2000). Neste trabalho, esse gene encontra-se induzido 15 minutos após o tratamento de pressão. Um fato interessante observado foi que muitos genes envolvidos com a via de PKC, assim como *PST1*, têm seu nível de indução aumentado 15 minutos após o estresse.

#### 4.1.7.- Análise dos genes intermembranares e endomembranares

Avaliou-se, também, o comportamento dos genes responsáveis por codificar proteínas intermembranares e endomembranares (figura 7). Os genes que se comportam diferentemente do grupo são: *AQY1*, um canal de água esporo-específico que medeia o transporte de água através da membrana; e *TFS1* envolvida na regulação da PKA. Os valores de expressão destes genes são mostrados na Anexo 2.

*AQY1*, está envolvido na mediação do transporte de água através da membrana celular, e podem desempenhar um papel na maturação de esporos, provavelmente permitindo o escoamento de água; pode também estar envolvido na tolerância ao frio (SIDOUX-WALTER et al., 2004; TANGHE et al., 2002; LAIZE et al., 1999). Neste trabalho, este gene apresentou um aumento na expressão logo após o piezotratamento e 10 minutos depois do estresse.

Outro gene relacionado com a via de PKA, o gene *TFS1* está envolvido com a inibição de Ira2p, regulador negativo de RAS (CHAUTARD et al., 2004). Sua transcrição também é modulada pela resposta ao estresse, sendo que sua expressão é elevada após estresse oxidativo, mudança diauxica e estresse por calor (BOY-MARCOTTE et al., 1999; BOY-MARCOTTE et al., 1998; GODON et al., 1998). Mais uma vez mostrando que a via de PKA pode ter um importante envolvimento em resposta à alta pressão hidrostática.



**Figura 9**-Expressão relativa dos 158 dos genes intermembranares e endomembranares medidos imediatamente após o estresse por alta pressão hidrostática, 5, 10 e 15 minutos depois o estresse. Os círculos representam os genes diferencialmente expressos.

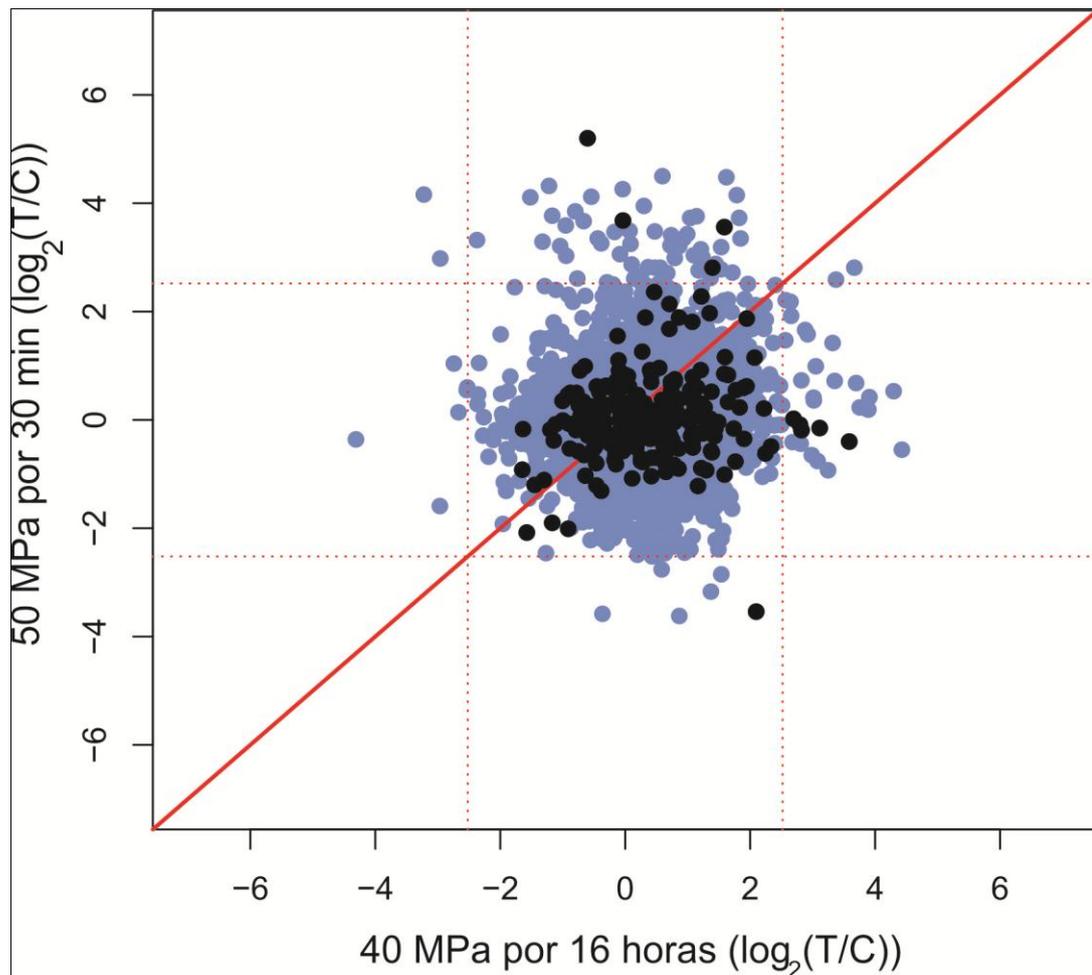
#### 4.2.- Comparação com o estresse por alta pressão em longos períodos

Para demonstrar as particularidades do estresse causado às leveduras imediatamente após a aplicação da alta pressão hidrostática por 30 minutos e 15 min após o tratamento, foi realizada uma análise de correlação entre estes tratamentos e o tratamento de 40 MPa por 16 h (IWAHASHI et al., 2003). Iwahashiet al. (2003) mostraram em seu estudo, que 16 horas sob pressão de 40 MPa é tempo suficiente para remodelar toda sua estrutura da célula de levedura. Além disso, este tratamento continha o valor de pressão, encontrado nos bancos de dados, mais próximo aos valores de pressão de 50 MPa.

Para análise comparativa, os grupos de genes avaliados anteriormente foram incorporados em dois grandes grupos. O primeiro referente à parede celular, que inclui os genes do metabolismo de polissacarídeos, biogênese da parede celular e genes localizados na parede celular. O segundo grupo possuía genes relacionados à membrana plasmática, nesse grupo são incluídos genes do metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides, além de representantes da biogênese de membrana plasmática, proteínas integrais de membrana e endomembranares. Para gerar os gráficos, foi construído um software na plataforma estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), possibilitando verificar os genes analisados, que foram marcados em preto (pontos pretos) e os demais genes, que foram marcados em azul (pontos azuis).

##### 4.2.1.- Análise dos genes relacionados à parede celular

O gráfico apresentado na Figura 8 compara o tratamento de 50 MPa por 30 minutos e 40 MPa por 16 horas e mostra que a maioria dos genes relacionados com a parede celular apresentaram pouca variação em sua expressão, em ambos os tratamentos. Os genes que foram induzidos em 50 MPa por 30 min e que variaram pouco na adaptação ao tratamento com pressão de 40 MPa por 16 h, foram: *GLC3*, *GLN1*, *GSY1*, *GSY2* e *GPH1* (os valores da expressão destes genes estão apresentados na Anexo 2).



**Figura 10 – Gráfico de correlação dos genes relacionados à parede celular (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes.**

Este grupo de genes é caracterizado, em grande parte, por pertencerem ao metabolismo de glicogênio e à biossíntese de glicogênio e amido. Já é conhecido que o conteúdo de glicogênio varia fortemente e rapidamente em resposta às mudanças nas condições ambientais, incluindo escassez de nutrientes, choque térmico, estresse osmótico e oxidativo (PARROU et al., 1997).

François et al. (2012) propôs que o estresse causado na parede celular ou na membrana podem, de alguma forma, ativar *PSK1/2*, que são quinases efetoras da via PAS quinase, as quais induzem a fosforilação da enzima Gph1p, responsáveis pela degradação de glicogênio e formação de glicose-1-fosfato – um dos

precursores para formação do  $\beta$ -glucano e trealose. Além disso, Psk1/2p inibe a formação de glicogênio por fosforilar Gsy2p e também induzir a formação de  $\beta$ -glucano pela ativação da enzima Ugp1p. O gene *PSK1* encontra-se induzido nos tratamentos de 50 MPa por 30 minutos e 5, 10, 15 min após a pressurização.

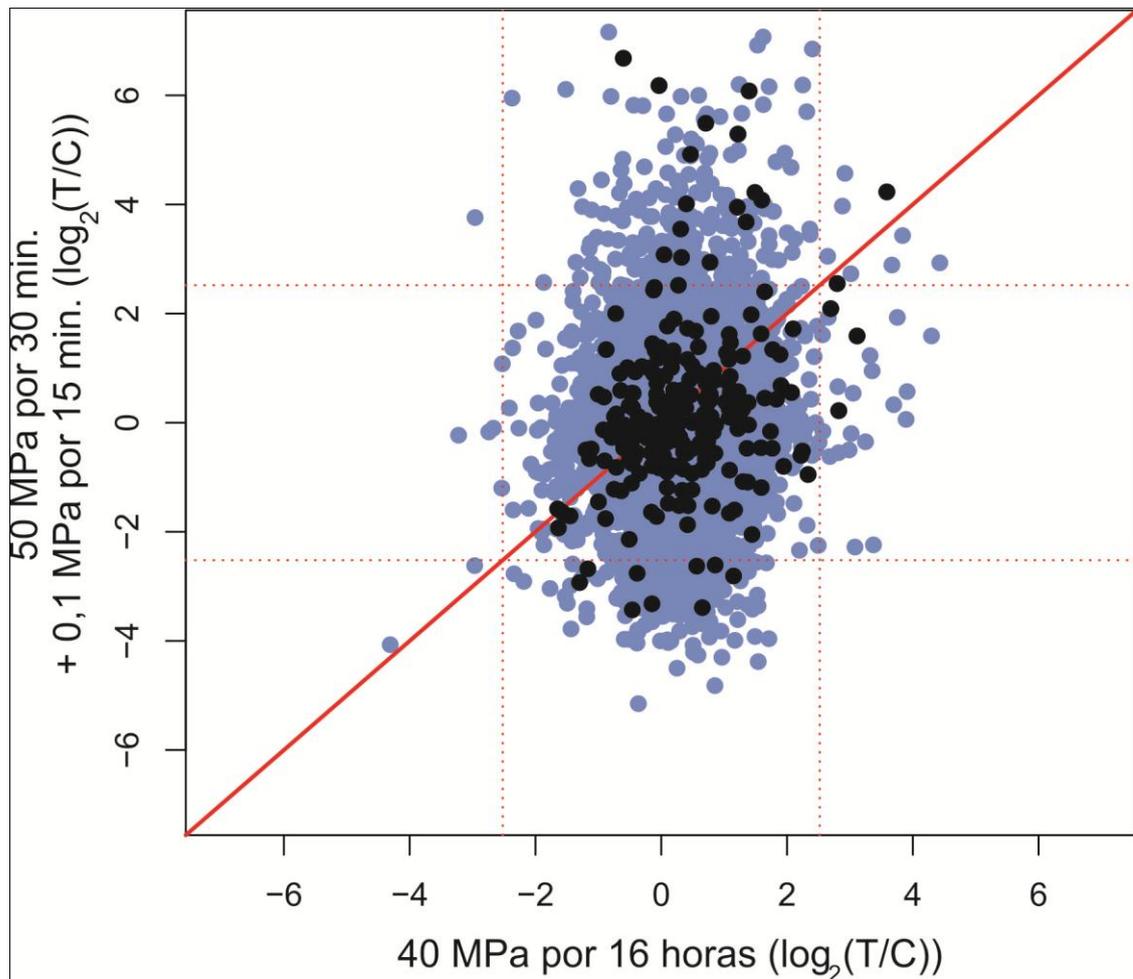
Ao contrário, alguns genes estão induzidos no tratamento de 40 MPa por 16 horas, e variaram muito pouco após o tratamento de 50 MPa por 30 min, são eles, *TIP1*, *CRH1*, *PIR3*, *SLT2*, *HSP150*, *SED1*. O gene *PIR1* sofreu repressão no tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min e está aumentado na pressão de 40 MPa por 16 h. Valores da expressão desses genes estão apresentados na Anexo 2.

No período de 16 horas sob estresse de alta pressão hidrostática, vários genes induzidos estão relacionados com os constituintes estruturais da parede celular. O efeito da HHP poderia induzir, primeiramente, os genes que se relacionam com a formação de  $\beta$ -glucano ou mesmo trealose, um carboidrato conhecido, também, por estabilizar a membrana plasmática em condições de estresse, e mais tardiamente, requisitar os genes para reconstrução da parede da celular, entretanto para confirmar esta hipótese seriam necessários mais experimentos.

A Figura 9 apresenta um gráfico que correlaciona os tratamentos de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente por 15 min e o tratamento de 40 MPa por 16 h. Verifica-se um maior número de genes relacionados com a parede celular sendo induzidos após 15 minutos de incubação à pressão ambiente quando comparado ao tratamento por 40 MPa por 16 horas. Além disso, nota-se que a maioria dos genes induzidos durante a alta pressão apresentaram valores de expressão maiores para o tratamento de 50 MPa. Os principais genes induzidos 15 min após o piezotratamento e que foram pouco afetados no tratamento de 40 MPa estão listados na Anexo 3, sendo eles, *ECM4*, *GLG1*, *SDP1*, *GLC3*, *STF2*, *MYO3*, *GDB1*, *SGA1*, *GSY1*, *GSY2*, *CAP1*, *SPI1*, *ECM38* e *GPH1*.

Os principais termos ontológicos encontrados nesse grupo de genes referem-se ao metabolismo de glicogênio, ao metabolismo de amido e sacarose e a resposta a estímulos abióticos. Um mecanismo utilizado pelas leveduras para proteger o sistema interno dos efeitos da variação do meio ambiente é iniciar um programa de

expressão comum de genes que, geralmente, protege a célula durante momentos de estresse, este programa refere-se à resposta ao estresse ambiental (ESR, sigla em inglês) (GASCH, 2002). Vários genes induzidos 15 minutos após o tratamento com alta pressão foram também induzidos após o estresse térmico.



**Figura 11- Gráfico de correlação dos genes relacionados à parede celular (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes.**

Já foi relatado que células pré-tratadas com alta pressão hidrostática seguida de um período de incubação à pressão atmosférica e depois submetidas ao choque térmico adquirem proteção para o estresse por temperatura (PALHANO et al., 2004a). A indução destes genes pode estar relacionada com esta resposta.

Já os genes que são induzidos a 40 Mpa por 16h e que não apresentaram variações de expressão 15 minutos após o tratamento de 50 MPa, foram: *TIP1*, *RLM1*, *CRH1*, *SLT2*. Os valores referentes à expressão destes genes estão apresentados na Anexo 3. O termo que está mais bem associado a este grupo é a organização da estrutura externa do encapsulamento. Mesmo 15 minutos após HHP foi percebido que quinases relacionadas à construção da parede continuaram com pouca variação, apesar de *SLT2*, enzima que possui papel fundamental na via de integridade celular, apresentar um leve aumento em sua expressão.

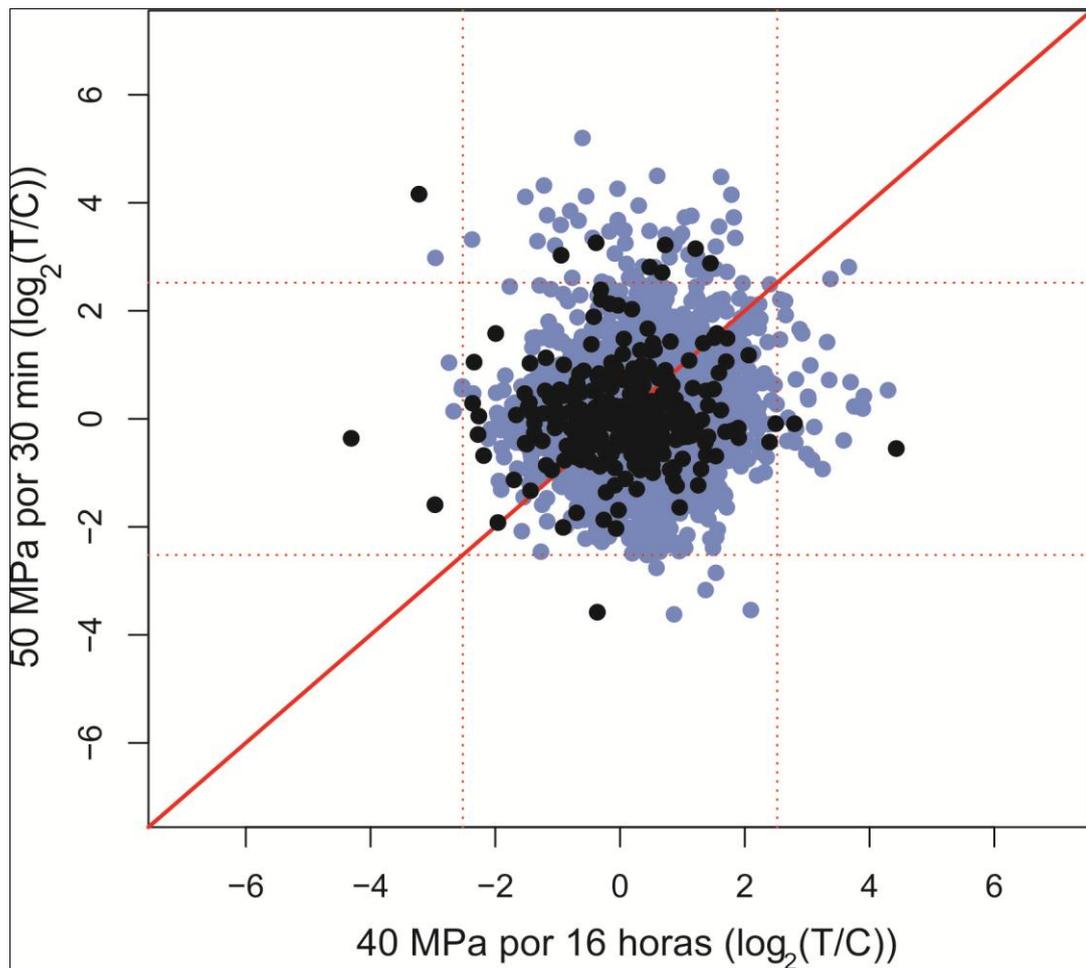
#### 4.2.2.- Análise dos genes relacionados à membrana

Quanto aos genes relacionados à membrana plasmática nos tratamentos de 50 MPa por 30 Min e 40 MPa por 16 h (Figura 10) foi notado que a maioria deles, assim como os genes relacionados à parede, não apresentam grandes variações na expressão. Entretanto, percebe-se que mais genes relacionados à membrana plasmática foram induzidos quando comparados com os genes relacionados com a parede celular. Dois grupos diferentes destacam-se nesta figura, sendo um grupo em que os genes foram induzidos no tratamento de 50 MPa por 30 minutos e apresentaram pouca variação no tratamento de 40 MPa por 16 h, e o outro grupo, em que os genes foram induzidos no tratamento de 40 MPa por 16 h, mas não no estresse de 50 MPa por 30 min.

Os genes induzidos no piezotratamento por 30 minutos, mas não no tratamento por 16 horas, foram: *AGP1*, *YRO2*, *PHM7*, *PUT4*, *GIT1*, *MEP1* e *SEO1*. O gene *DIP5* apresentou a expressão aumentada no tratamento por 30 minutos com alta pressão e no tratamento com 16 horas encontra-se muito reprimido. Os valores destes genes foram mostrados na Anexo 2. Os principais termos associados a este grupo são proteínas integrais de membrana e permeasse para aminoácidos.

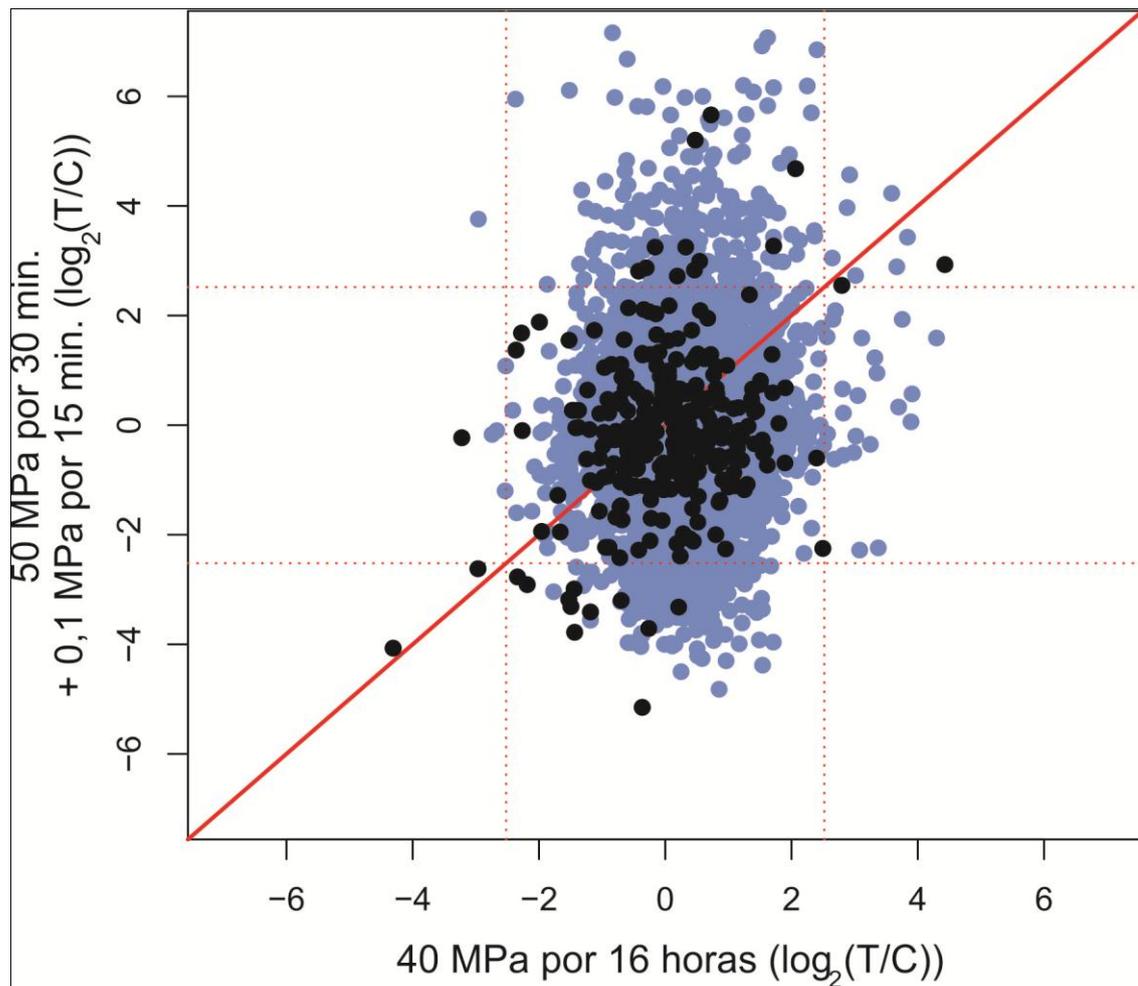
Em várias situações estressantes a levedura não acumula alguns aminoácidos (KAINO; TAKAGI, 2008). As permeases de aminoácidos são responsáveis pelo transporte de substrato para o interior da célula em resposta as necessidades nutricionais da levedura (PROCOPIO et al., 2011). Além disso, alguns aminoácidos, como por exemplo, a prolina, tem importante papel na resposta ao estresse como osmoprotetore, também, está envolvido na estabilização de membrana e proteínas (TAKAGI, 2008). A indução destes genes é um indicativo que sob o estresse de alta pressão a célula também estaria sofrendo estresse osmótico.

Os genes *PST1*, *YPS3* e *SED1* foram induzidos no tratamento de 40 MPa por 16 h, mas não apresentaram grande variação no tratamento de 50 MPa por 30 min. Os valores referentes a estes genes encontram-se na Anexo 2. O termo ontológico aos quais estes genes se referem é proteína de ancoragem-GPI. Estes genes estão envolvidos nos mecanismos de defesa celular, principalmente, na defesa contraestresses que causam dano na parede celular (KRYSAN et al., 2005; JUNG; LEVIN, 1999; SHIMOI et al., 1998).



**Figura 12- Gráfico de correlação dos genes relacionados à membrana plasmática (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes.**

Com relação aos genes expressos 15 minutos após o tratamento de pressão (Figura 11), observa-se um maior número de genes, relacionados à membrana plasmática, reprimidos quando comparado com o tratamento de 50 MPa por 30 min. Entre os genes que foram induzidos 15 minutos após a pressão, mas não no estudo com 40 MPa por 16 horas, estão: *YRO2*, *PHM7*, *YCR061w*, *MCR1*, *VMR1*, *YGR149w*, *YPC1*, *BPT1* e *GPT2*. A Anexo 3 mostra os valores de expressão destes genes. Os principais termos associados a estes genes são proteínas integrais de membrana e vacúolo.



**Figura 13- Gráfico de correlação** dos genes relacionados à membrana plasmática (pontos pretos) após tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente e 40 MPa por 16 h. Os pontos azuis referem-se aos demais genes.

Sabe-se que valores de pressão de 200 MPa causam o desaparecimento dos vacúolos (Fernandes et al., 2001). Talvez a expressão desse grupo de genes seja uma resposta a uma injúria inicial ocorrida nesta organela e, possivelmente, com passar do tempo em alta pressão a célula seja capaz, de alguma forma, responder a perturbações ocorridas nos vacúolos.

Quanto aos genes induzidos a 40 MPa por 16 h e que não sofreram modificação após 15 minutos à pressão ambiente pode-se citar, *MET1*, *ERG25* e *POX1*. Estes genes estão relacionados ao processo de oxi-redução. Os valores de expressão destes genes são mostrados na Anexo 3.

*MET1* está envolvido com a síntese de siroheme, grupo prostético utilizado na enzima sulfito redutase para reduzir sulfito a sulfeto (HANSEN et al., 1997), sua indução já foi relatada em células submetidas ao estresse oxidativo (CARMEL-HAREL et al., 2001). Sulfito é uma substância utilizada como conservante em alimento, bebidas e produtos farmacêuticos, sendo considerada comotóxica para os microrganismos (TAYLOR et al., 1986).

*ERG25* codifica a C-4 metil esterol oxidase que catalisa o primeiro passo para remover dois grupos C-4 metil na biossíntese de ergosterol (BARD et al., 1996). Já é conhecido que estresses que causam desestabilização na membrana, tais como, choque osmótico, etanol, frio e alta pressão hidrostática mostram uma discreta indução de *ERG25* (FERNANDES et al., 2001; ESTRUCH, 2000; BROACH; DESCHENES, 1990; BROEK et al. 1985; WEBER; DRICKAMER, 1983). *POX1* codifica uma enzima envolvida na beta-oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos (DMOCHOWSKA et al., 1990) e sua indução já foi relatada durante a esporulação (BORDE et al., 2009).

A indução desses genes parece estar mais envolvida com a manutenção da membrana e a resposta ao estresse na adaptação à alta pressão hidrostática por períodos mais longos que por períodos mais curtos.

É possível também encontrar genes que foram induzidos nos dois tratamentos, tais como: *PST1*, *SED1* e *OPI3*. Estes genes referem-se à organização da parede celular. Os valores de expressão são mostrados na Anexo 3.

A indução de alguns genes envolvidos com a via de sinalização da integridade celular também foi notada 15 minutos após a pressurização, mesmo que as quinases relacionadas com essa via ainda não estejam induzidas.

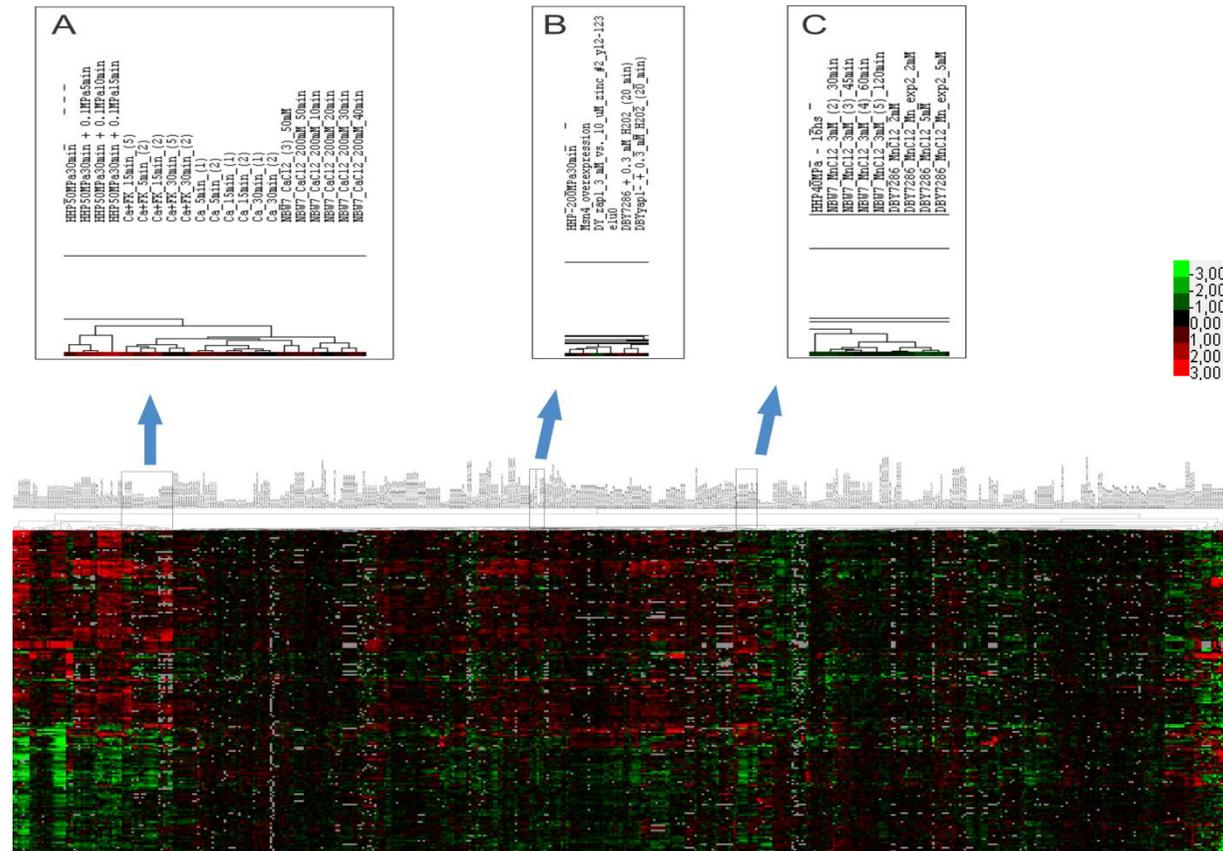
Outro grupo gênico que se destaca, refere-se aos genes que foram reprimidos à 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente e que pouco variaram à 40 MPa por 16 h, foram eles: *IZH4*, *ZRT1*, *AGP1*, *HXT6*, *THI7*, *HXT1*, *YEH1*, *OLE1*, *GNP1* e *IZH1* (os valores de expressão são mostrados na Anexo 3). A maioria destes genes são proteínas integrais de membrana com domínios citoplasmáticos envolvidas no transporte de vários compostos, tais como zinco, glicose e

aminoácidos. Exceto por *YEH1*, *OLE1* e *IZH1*, os genes estão reprimidos nos dois tratamentos, o momento metabólico da célula talvez torne desnecessário a expressão destes genes.

Entre os genes que estão reprimidos em ambos os tratamentos encontram-se: *HXT7*, *HXT4*, *HXT2* (os valores de expressão destes genes estão contidos na Anexo 3). Tanto 15 minutos após a pressão quanto a célula submetidas a um longo período de estresse parece ter um mecanismo comum quanto à entrada de glicose na célula.

#### 4.3.- Caracterização hierárquica da pressão com outros estresses

Utilizou-se do agrupamento hierárquico do microarranjo contendo os genes relacionados com a parede celular e membrana para mostrar as discrepâncias e as similaridades entre os estresses por alta pressão hidrostática e diversos outros estresses. O algoritmo de agrupamento hierárquico foi usado para agrupar genes com base no padrão de similaridade que varia ao longo das amostras (EISEN et al., 1998). Este método é muito utilizado em pesquisas com câncer, as quais pretendem identificar as semelhanças entre os diferentes tipos de câncer, com base na similaridade da expressão gênica (ALIZADEH et al., 2000). Os dados são mostrados em uma matriz na qual as linhas representam o resultado da hibridização de um determinado gene e as colunas representam o resultado da variação medida em todos os genes em uma amostra.



**Figura 14**– Dendrograma Geral com classificação hierárquica de vários estresses. As cores vermelhas representam os genes induzidos, enquanto as verdes representam os genes reprimidos. Os aumentos apresentam os clados com os tratamentos com a HHP em que (A) representa o tratamento de 50MPa por 30 min, 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 5min, 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 10min e 50MPa por 30 min + 0,1 MPa por 5min; (B) 200 MPa por 30min; e (C) 40 MPa por 16h.

Para construir a matriz do dendograma foi necessário criar um software na plataforma R que selecionava e alinhava os diferentes estresses obtidos nos bancos de dados. Em seguida foi utilizado o software Cluster versão 3.0 (EISEN et al., 1998) que fez agrupamento hierárquico. Para visualizar os resultados foi utilizado o software TreeView versão 1.1.4r3 (SALDANHA, 2004), os níveis de expressão de cada gene são representados pela variações das cores, na qual a cor vermelha representa valores induzidos, enquanto as cores verdes representam genes que são reprimidos.

A Figura 12 mostra o agrupamento hierárquico dos estresses de 50 MPa por 30 minutos, seguido de incubação à pressão ambiente de 5, 10 e 15 min relacionado com o tratamento de 200MPa por 30 min (FERNANDES et al., 2004) e de 40MPa por 16h (IWAHASHI et al., 2005), além de mais 498 diferentes fontes de estresse conduzidos por Gasch et al. (2000). Esta figura mostra uma complexa, mas ordenada imagem das variações nos padrões de expressão gênica da levedura quando submetida aos diferentes tipos de estresse, com grandes conjuntos de genes exibindo coordenada expressão nos diferentes tratamentos.

As análises dos genes relacionados à parede e à membrana (Figura 12a), revelaram que os quatro tratamentos com 50 MPa, apresentam grande semelhança com os estresses causados pela suplementação de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,4M) e FK506 (1,0 g/ml) por 15 min (Yoshimoto et al. 2002). Este estudo pretendia avaliar o comportamento da célula de *Saccharomyces cerevisiae* frente aos efeitos causados pelo acúmulo de cálcio e sódio e a inibição da calcineurina para evidenciar qual seria o principal regulador desta via.

A calcineurina, uma proteína fosfatase  $\text{Ca}^{2+}$ /dependente de calmodulina altamente conservada, tem um importante papel no acoplamento de sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  para respostas celulares, tais como manutenção da viabilidade celular (ARAMBURU et al., 2000; MAZUR et al., 1995). A indução da sinalização dependente de calcineurina, aumenta a expressão de GSC2 que codifica a  $\beta$ -1,3-glucano sintase (MAZUR et al., 1995). O imunossupressor FK506 (tacrolimus) é um inibidor específico de calcineurina (LIU et al., 1991).

A alta pressão hidrostática, interessante, parece causar um efeito muito similar nos genes de parede e membrana causados pela suplementação de cálcio e supressão da calcineurina. Fernandes et al. (2001) mostrou que a HHP tem forte atuação nos vacúolos que são quebrado e desaparecem a 200 MPa. Talvez a saída do  $\text{Ca}^{2+}$  dos vacúolos para o citoplasma pelo efeito da alta pressão nestas organelas seja um dos motivos que fazem com estes estresses sejam similares na resposta à nível de expressão gênica.

Outro fato interessante é que o piezotratamento de 200 MPa por 30 min e de 40 MPa por 16 h mostraram-se muito diferentes da pressão de 50 MPa deste estudo e por sua vez foram agrupados em clados muito distantes. O tratamento de alta pressão por 200 MPa (Figura 12b) mostrou um perfil de expressão gênico muito mais parecido com o perfil de células que tiveram superexpresso o gene *MSN4*. Já, o tratamento com alta pressão por 16 horas (Figura 12c) tem um perfil de expressão similar à de células submetidas à  $\text{MnCl}_2$  à 3mM por 30 minutos.

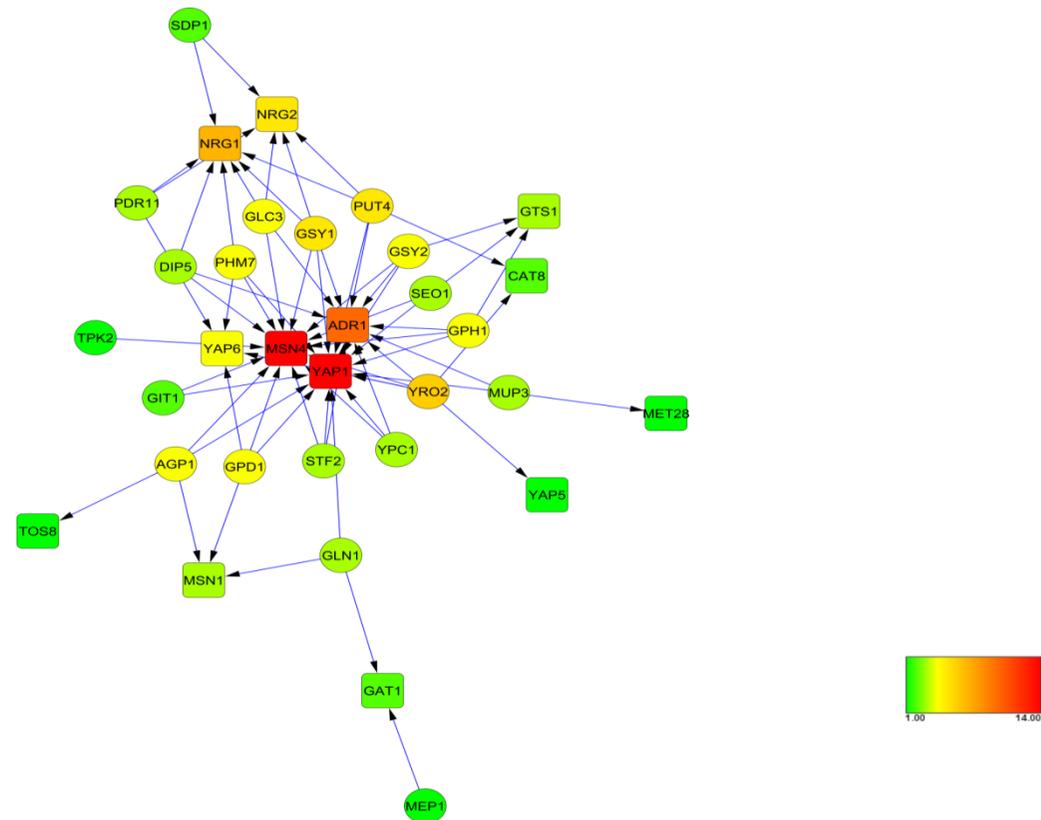
#### 4.4.- Avaliação dos fatores de transcrição responsáveis pela resposta ao estresse da parede e membrana celulares

Para fazer essa avaliação foi necessário desenvolver uma rotina computacional para avaliar quais eram os fatores de transcrição que também tinham sido induzidos dentro o grupo de genes que apresentavam expressão acima de 2. Utilizou-se a plataforma R para fazer esta tarefa. Além disso, foi necessário acessar o banco de dados YEASTRACT para obter a relação dos fatores de transcrição que apresentam documentada interação com os genes selecionados (ABDULREHMAN et al., 2011; MONTEIRO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2006). Utilizou-se também do software Cytoscape versão 2.8.2 para construir as redes de interação (SMOOT et al., 2010).

A análise dos fatores de transcrição foi feita com os dados de expressão da célula imediatamente e 15 minutos após o piezotratamento. As figuras apresentam os fatores de transcrição em quadrados e os demais genes em círculos, numa variação de cores de verde ao vermelho que dizem o quanto os nodos são conectados, sendo os verde menos conectados e os vermelhos mais conectados.

A Figura 13 mostra que para os genes induzidos de parede e membrana foram requisitados 13 fatores de transcrição, sendo os principais, e que mais possuem conexões, *MSN4*, *YAP1*, *ADR1* e *NRG1*.

*MSN4* codifica um fator de transcrição que regula, juntamente com Msn2p, a resposta geral ao estresse em *S. cerevisiae* (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Aproximadamente 200 genes têm sua expressão regulada por Msn2p e Msn4p em resposta a vários estresses, incluindo estresse por calor, choque osmótico, choque oxidativo, etanol e alta pressão hidrostática, por se ligar ao elemento STRE (DOMITROVIC et al., 2006; GASCH et al., 2000; CAUSTON et al., 2001; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Neste tratamento, o gene *MSN4* mostrou-se induzido 0,98 vezes.



**Figura 15**– Rede de regulação dos fatores de transcrição superexpressos e seus respectivos alvos também induzidos no tratamento de 50 MPa por 30 min. As cores representam a conectividade do gene na rede na qual as cores verdes apresentam pouca conectividade e vermelhas muito conectividade.

O fator de transcrição *YAP1* é responsável por ativar os genes de resposta antioxidante ao estresse oxidativo (TEMPLE et al., 2005). Assim como Msn2p, Yap1p tem sua atividade transcricional regulada pela localização celular (LIU; THIELE, 1996). O resultado do microarranjo mostrou que *YAP1* teve um aumento em sua expressão de 0,83 imediatamente após o piezotratamento.

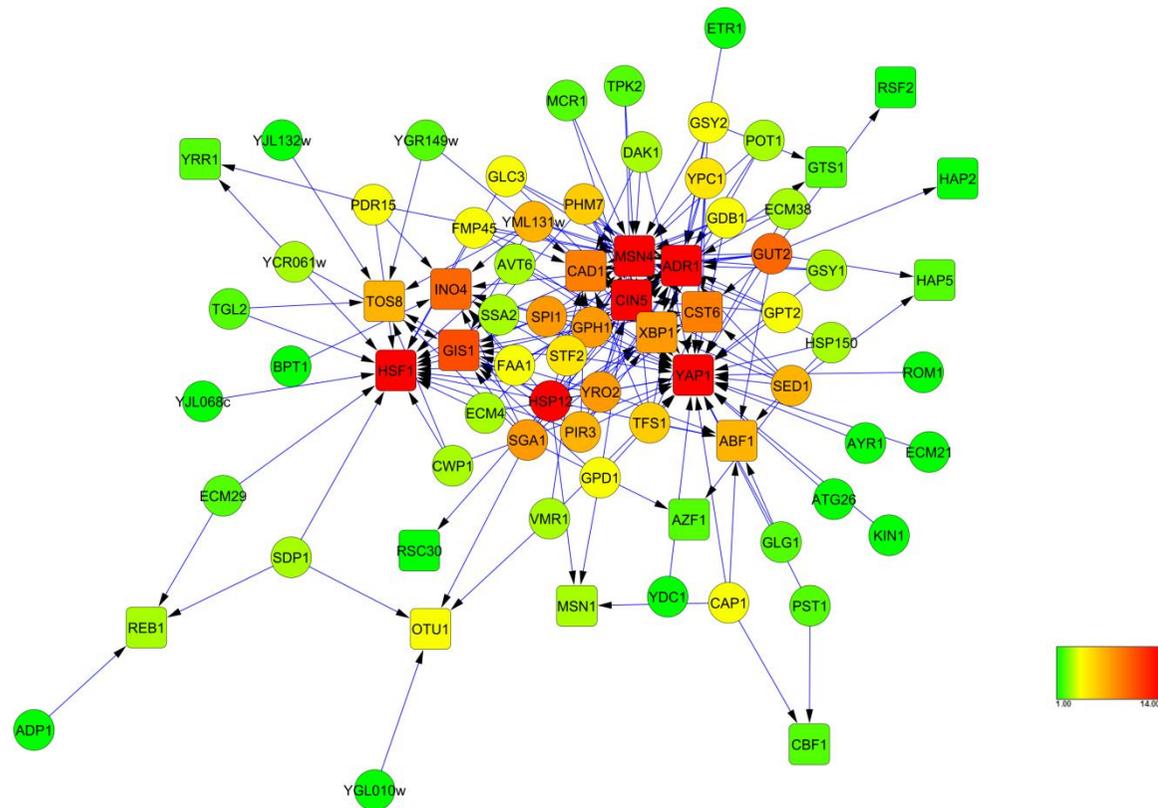
O gene *ADR1* codifica um fator de transcrição que está envolvido na indução de genes que são regulados pela repressão de glicose (YOUNG et al., 2003). Inicialmente Adr1p foi identificada mediando a expressão da enzima álcool desidrogenase (*Adh2p*), mas agora é conhecido por controlar a atividade de genes envolvidos na fermentação de glicose, metabolismo de glicerol, utilização de ácidos graxos e biogênese de peroxissomos (TACHIBANA et al., 2005; CIRIACY, 1975). No primeiro tempo testado a alta pressão hidrostática induz a expressão deste gene em 1,9 vezes.

*NRG1* codifica um repressor transcricional que recruta o complexo Cyc8p-Tup1p aos promotores, que medeia a repressão de glicose e regula negativamente uma variedade de processos, incluindo o crescimento filamentosos e a resposta ao pH alcalino (ZHOU; WINSTON, 2001; KUCHIN et al., 2002). Além disso, já foi mostrado que *NRG1* está envolvido também com a regulação dos genes que contêm o elemento STRE, e sua deleção causa diminuição da tolerância da célula ao congelamento (VYAS et al., 2005). O gene *NGR1* apresentou-se induzido 1,55 vezes, no primeiro tratamento.

Manter uma adequada expressão transcricional durante o desenvolvimento ou, em resposta à mudanças do ambiente, requer um equilíbrio delicado entre reguladores transcricionais com a ativação e repressão das funções celulares (HANLON et al., 2011). Aqui se verifica que a HHP pode estar causando uma coordenada regulação dos genes relacionados à resposta ao estresse, ativando tanto indutores quanto repressores de elemento STRE, além disso, pode se verificar um possível efeito *sinérgico* dos fatores de transcrição nos quais de maneira geral apresentam baixo nível de indução em sua expressão, entretanto vários fatores de transcrição que tem os mesmos alvos são requisitados.

Em relação aos fatores de transcrição induzidos 15 minutos após o piezotratamento (Figura 14) é notável um maior número de fatores de transcrição sendo induzido. Entre os que mais possuem conexões estão *HSF1*, *CIN5*, *GIS1*, *INO4*, *CST6*, além de *MSN4*, *ADR1* e *YAP1* que continuam aumentados neste tratamento.

O gene *HSF1* codifica um fator de transcrição que regula a transcrição de centenas de alvos em resposta ao estresse, incluindo genes envolvidos no dobramento de proteínas, detoxificação, geração de energia, metabolismo de carboidrato e organização da parede celular (HAHN et al., 2004; EASTMOND; NELSON, 2006). *CIN5* é um fator de transcrição pertencente a família yAP-1 que interage fisicamente com o complexo Tup1-Cyc8 e recruta Tup1p para seus alvos e é comumente relacionado a resposta ao estresse (HANLON et al., 2011).



**Figura 16-** Rede de regulação dos fatores de transcrição superexpressos e seus respectivos alvos também induzidos no tratamento de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15 min. As cores representam a conectividade do gene na rede na qual as cores verdes apresentam pouca conectividade e vermelhas muito conectividade.

O fator de transcrição Gis1p envolvido na expressão de genes durante a limitação de nutrientes e com a via de sinalização RAS/cAMP, tem sua atividade modulada por limitada proteólise mediada por proteassoma(ZHANG; OLIVER, 2010; PEDRUZZI et al., 2000). *INO4* codifica um fator de transcrição que é requerido para desrepressão de genes envolvidos com a biossíntese de fosfolipídeos(SANTIAGO; MAMOUN, 2003), análise em sílica também sugere que ele possa estar envolvido com o controle da resposta ao estresse (ERNST et al., 2007). *CST6* é um fator de transcrição envolvido na utilização de carbono e conhecido por ser afetado pela PKA e estresse (GARCIA-GIMENO; STRUHL, 2000).

A rede de interação entre os fatores de transcrição e os genes superexpressos relacionados à parede celular e membrana obtida 15 minutos após o estresse pelo tratamento com alta pressão tem uma notável complexidade quando comparada a obtida com o estresse de 50 MPa por 30 min. Além disso, novamente é mostrada uma interessante rede com ativadores e repressores induzidos.

#### 4.5.- Confirmação dos genes por RT-PCR em tempo real

Para confirmar os dados obtidos no microarrajão, foram feitos testes de RT-PCR em tempo real para determinar a expressão relativa (RQ) de 10 genes (Tabela 1) nos diferentes tratamentos com alta pressão hidrostática. O teste Pearson mostrou uma forte correlação (maior que 0,7) entres os dados obtidos do RT-PCR em tempo real e os resultados de microarrajão (Figura 15).

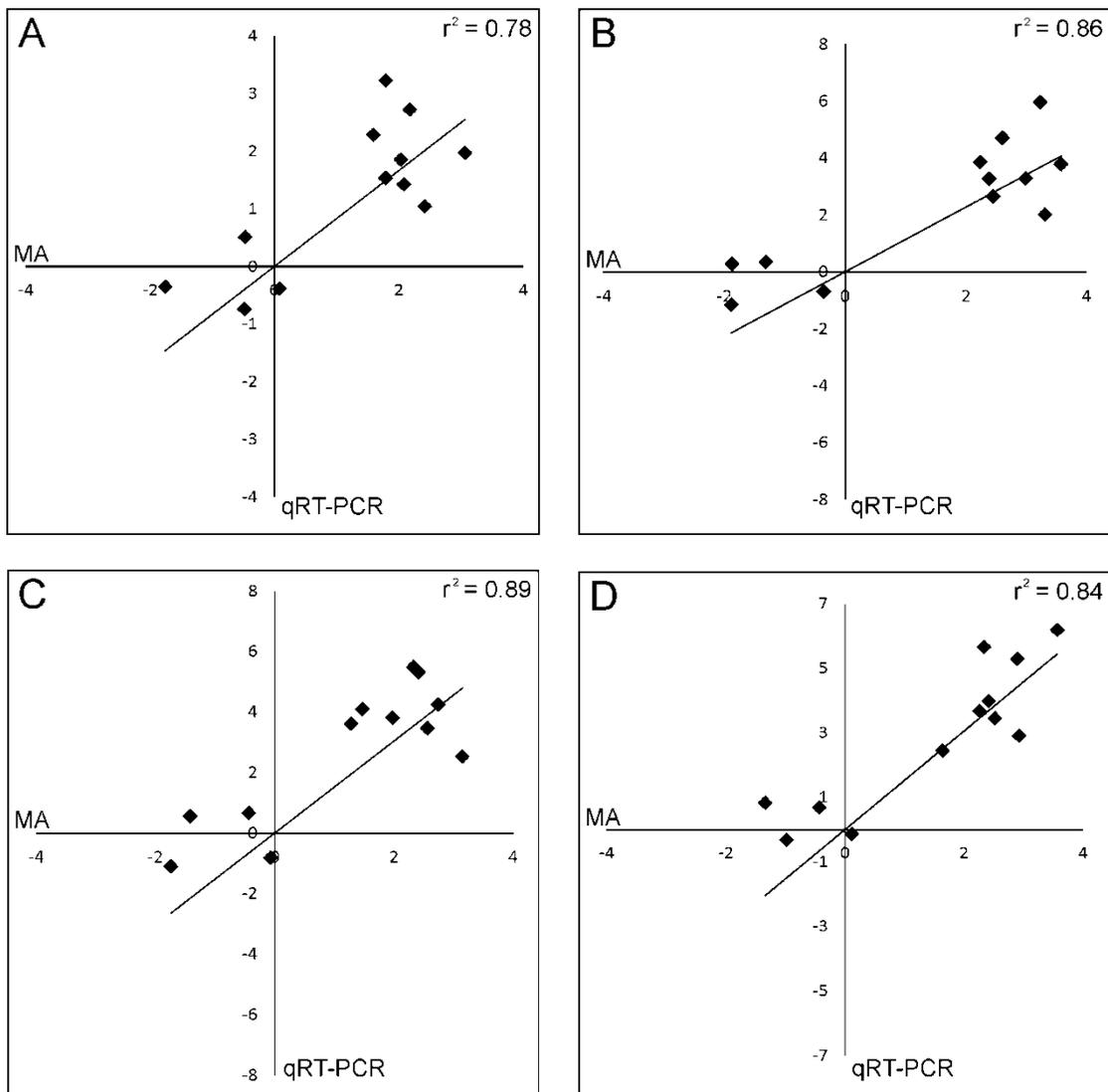


Figura 15– Gráfico de correlação entre as médias do nível de expressão relativa (RQ) obtidos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) e microarranjo (MA). Os dados são plotados em  $\text{Log}_2$  e os coeficientes da correlação de Pearson são dados para os genes testados nos diferentes tratamentos com alta pressão hidrostática, sendo (A) 50 MPa por 30min; (B) 50 MPa por 30min + 0,1 MPa por 5 min; (C) 50 MPa por 30min.+ 0,1 MPa por 10 min; (D) 50 MPa por 30min.+ 0,1 MPa por 15 min.

## 5.- CONCLUSÃO

Verificou-se que o tratamento de 50 MPa por 30 min na linhagem BT0605 mostra, claramente que entre os genes envolvidos com a biogênese da parede celular, os genes que estão relacionados com a proteção desta organela são prontamente ativados pela alta pressão hidrostática, enquanto que os genes que são envolvidos na estrutura da parede celular necessitam de pelo menos 5 minutos à pressão ambiente para serem induzidos.

Muitos trabalhos já demonstraram que a membrana é o principal alvo da alta pressão hidrostática, em nosso estudo este fato é reforçado, mostrando vários genes envolvidos na biossíntese de lipídeos sendo induzidos em todos os tratamentos, talvez para um possível reparo desta organela.

A pressão de 50 MPa por 30 min., induz alguns genes envolvidos com a esporulação, sendo que estes genes permaneceram induzidos por até 10 min. Após 15 min. a expressão destes genes cairam drasticamente, chegando a serem reprimidos.

Curiosamente, os tratamentos com alta pressão aplicados neste estudo induziu vários genes relacionados com a via de sinalização PKA, a qual tem uma relação negativa na maioria dos estresses.

A indução dos genes relacionados com a via PAS quinase, envolvida na modulação do metabolismo de glicogênio e de  $\beta$ -glucano, sugere que ela tenha função essencial na resposta ao estresse por pressão hidrostática.

A indução de permeases de prolina após o tratamento com a alta pressão hidrostática pode estar envolvida tanto com a proteção de proteínas e membranas, quanto na resposta a um possível estresse osmótico.

Os tratamentos de 50 MPa por 30 min e o tratamento seguido de 15 min à pressão ambiente podem ser considerados como estresses mais brandos, com relação à indução de genes relacionados à membrana e parede celulares, quando comparados com o estresse de 40 MPa por 16 h. Entretanto, o tratamento de 50

MPa por 30 min seguido de incubação de 15 min à pressão ambiente demonstrou uma alta indução de genes envolvidos com a via de integridade celular.

O agrupamento hierárquico dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática dos tratamentos com alta pressão mostrou grande semelhança com o estresse causado pela suplementação de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,4M) e o inibidor da calcineurina FK506 (1,0 g/ml) durante 15 minutos. Os estresse de 200 MPa por 30 minutos e 40 MPa por 16 horas mostraram-se bem diferentes dos tratamentos com pressão aplicados neste estudo, estes estresses apresentaram um perfil de expressão mais similar à células que tiveram superexpressas o gene *MSN4* e células submetidas  $\text{MnCl}_2$  à 3mM por 30 minutos, respectivamente.

Os dados de microarranjo revelaram que os principais fatores transcrição envolvidos na resposta da parede celular e membrana plasmática de *S. cerevisiae* em alta pressão hidrostática, foram: *MSN4*, *YAP1*, *ADR1* e *NRG1*. Enquanto que 15 minutos após o estresse, os principais reguladores foram *HSF1*, *CIN5*, *GIS1*, *INO4*, *CST6*, além dos genes *MSN4*, *YAP1*, *ADR1* observados anteriormente.

Estes resultados contribuem para o entendimento da resposta à HHP dos genes relacionados à parede celular e membrana plasmática. Além disso, este estudo poderá ajudar na investigação para aquisição de mecanismo de tolerância aos diferentes estresses nos processos biotecnológicos.

## 6.- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDULREHMAN, D. et al. YEASTRACT: providing a programmatic access to curated transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae* through a web services interface. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. D136-40, jan 2011.

ABE, F. Induction of DAN/TIR yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature. **FEBS Lett**, v. 581, n. 25, p. 4993-8, out 2007.

ABE, F. Effects of growth-permissive pressures on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. In: MICHIELS, C.; BARLETT, D. H.; AERTSEN, A. **High-Pressure Microbiology**. Washington: ASM Press, 2008. p. 167–179.

ABE, F.; HORIKOSHI, K. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 130, n. 2-3, p. 307-12, ago 1995.

ABE, F.; HORIKOSHI, K. Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 223-8, ago 1998.

ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 447-53, nov 1999.

AERTSEN, A. et al. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 7, p. 434-41, jul 2009.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Lett Appl Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 268-74, 2003.

ALEXANDRE, H. et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 498, n. 1, p. 98-103, jun 2001.

ALIZADEH, A. A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 503-11, fev 2000.

ARAMBURU, J.; RAO, A.; KLEE, C. B. Calcineurin: from structure to function. **Curr Top Cell Regul**, v. 36, p. 237-95, 2000.

ARROYO, J. et al. Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 44-6, jan 2009.

BABA, M.; OSUMI, M. Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells. **J Electron Microscop Tech**, v. 5, n. 3, p. 249–61, mar 1987.

BANUETT, F. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 2, p. 249-74, jun 1998.

BARD, M. et al. Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 186-90, jan 1996.

BARRETT, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. D1005-10, jan 2011.

BELLOCH, C. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Int J Food Microbiol**, v. 122, n. 1-2, p. 188-95, fev 2008.

BORDE, V. et al. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. **EMBO J**, v. 28, n. 2, p. 99-11, jan 2009.

BOY-MARCOTTE, E. et al. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol.** 1998 Mar;**180(5):1044-52.**, v. 180, n. 5, p. 1044-52, mar 1998.

BOY-MARCOTTE, E. et al. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 274-83, jul 1999.

BRAVIM, F. **Resposta de Saccharomyces cerevisiae ao estresse de alta pressão hidrostática**. TESE (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Do Espírito Santo, Vitória, 2011.

BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure and the cell membrane: stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1189, p. 127-32, fev 2010.

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

BROACH, J. R.; DESCHENES, R. J. The function of ras genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv Cancer Res**, v. 54, p. 79-139, 1990.

BROACH, J. R.; PRINGLE, J. R.; JONES, E. W. (Eds.). **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces**: Genome Organization, Translation, and Energetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.

BROEK, D. et al. Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 763-9, jul 1985.

ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 6-7, p. 569-78, abr 2005.

CAPPELLARO, C. et al. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. **EMBO J**, v. 13, n. 20, p. 4737-44, out 1994.

CAUSTON, H. C. et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 2, p. 323-37, fev 2001.

CHAUTARD, H. et al. Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 459-70, abr 2004.

CHEN, T.; PARKER, C. S. Dynamic association of transcriptional activation domains and regulatory regions in *Saccharomyces cerevisiae* heat shock factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 3, p. 1200-5, fev 2002.

CHENG, Q.; MICHELS, C. A. MAL11 and MAL61 encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 173, n. 5, p. 1817-20, mar 1991.

CIRIACY, M. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. **Mol Gen Genet**, v. 138, n. 2, p. 157-64, 1975.

COLUCCIO, A. et al. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 6, p. 1464-75, dez 2004.

DAVENPORT, K. R. et al. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. **J Biol Chem**, v. 270, n. 50, p. 30157-61, dez 1995.

DE NOBEL, J. et al. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, n. 6, p. 491-9, nov-dez 1990.

DIELBANDHOESING, S. et al. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 10, p. 4047-52, out 1998.

DIENHART, M. et al. Formation of the Yeast F1F0-ATP Synthase Dimeric Complex Does Not Require the ATPase Inhibitor Protein, Inh1. **J Biol Chem**, v. 277, n. 42, p. 39289-95, out 2002.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 2, p. 253-63, nov 2009.

DMOCHOWSKA, A. et al. Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. **Gene**, v. 88, n. 2, p. 247-52, abr 1990.

DOMITROVIC, T. et al. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 580, n. 26, p. 6033-8, nov 2006.

EASTMOND, D. L.; NELSON, H. C. Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. **J Biol Chem**, v. 281, n. 43, p. 32909-21, out 2006.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14863-8, dez 1998.

ERNST, J. et al. Reconstructing dynamic regulatory maps. **Mol Syst Biol**, v. 3, p. 74, 2007.

FERNANDES, P. M. How does yeast respond to pressure? **Braz J Med Biol Res.**, v. 38, n. 8, p. 1239-45, ago 2005.

FERNANDES, P. M. *Saccharomyces cerevisiae* response to high hydrostatic pressure. In: MICHIELS, C.; BARTLETT, D. H.; AERTSEN, A. **High-pressure microbiology**. Cambridge: American Society for microbiology, 2008. p. 145-166.

FERNANDES, P. M. et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Lett**, v. 556, n. 1-3, p. 153-60, jan 2004.

FERNANDES, P. M.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett Appl Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 42-6, jan 2001.

FERNANDES, P. M.; PANEK, A. D.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. **FEMS Microbiol Lett**, v. 152, n. 1, p. 17-21, jul 1997.

FOGUEL, D.; SILVA, J. L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11361-70, set 2004.

FOLCH-MALLOL, J. L. et al. The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 46, n. 1-2, p. 24-46, jan-jun 2004.

FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T.; PARROU, J. L. Genetics and Regulation of Glycogen and Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: LIU, Z. L. **Microbial Stress Tolerance for Biofuels Systems Biology**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, v. 22, 2012. p. 29-55.

GARCÍA, R. et al. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 284, n. 16, p. 10901-11, abr 2009.

GARCIA-GIMENO, M. A.; STRUHL, K. Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 12, p. 4340-9, jun 2000.

GASCH, A. P. The Environmental Stress Response: a common yeast response to environmental stresses. In: HOHMANN, S.; MAGER, P. **Yeast Stress Responses**. Heidelberg: Springer-Verlag, v. 1, 2002. p. 11-70.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241-57, dez 2000.

GODON, C. et al. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 273, n. 35, p. 22480-9, ago 1998.

GÖRNER, W. et al. Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. **Genes Dev**, v. 12, n. 4, p. 586-97, fev 1998.

GROSE, J. H. et al. Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. **EMBO J**, v. 26, n. 23, p. 4824-30, nov 2007.

GROSS, C.; WATSON, K. De novo protein synthesis is essential for thermotolerance acquisition in a *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase mutant. **Biochem Mol Biol Int**, v. 45, n. 4, p. 663-71, jul 1998.

GÜLDENER, U. et al. CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. D364-8, jan 2005.

GUSTIN, M. C. et al. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 4, p. 1264–1300, dez 1998.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. **Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, v. 169, 1991.

HAHN, J. S. et al. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 12, p. 5249-56, jun 2004.

HAMADA, K. et al. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. **J Bacteriol**, v. 181, n. 13, p. 3886-9, jul 1999.

HANLON, S. E. et al. The stress response factors Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 direct targeting of the conserved co-repressor Tup1-Ssn6 in *S. cerevisiae*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19060, abr 2011.

HANSEN, J. et al. Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the MET1 and MET8 genes. **FEBS Lett**, v. 401, n. 1, p. 20-4, jan 1997.

HARTMANN, C. . M. K.; DELGADO, A. Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic. **Innov Food Sci Emerg**, v. 7, p. 1–12, 2006.

HASHIKAWA, N.; SAKURAI, H. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 9, p. 3648-59, maio 2004.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. Introduction. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. 2. ed. Alemanha: Springer, 2003.

HONG, S. et al. SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, n. 1, p. 116-22, fev 1999.

IGUAL, J. C.; ESTRUCH, F. Signalling Stress in Yeast. **Food technol. biotechnol.** **38 (4) 263–276 (2000)**, v. 38, n. 4, p. 263–276, 2000.

IWAHASHI, H. et al. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiol Lett**, v. 64, n. 2-3, p. 325-8, maio 1991.

IWAHASHI, H. et al. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Extremophiles**, v. 7, n. 4, p. 291-8, ago 2003.

IWAHASHI, H. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. **FEBS Lett**, v. 579, n. 13, p. 2847-52, maio 2005.

JUNG, U. S.; LEVIN, D. E. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1049-57, dez 1999.

KAINO, T.; H., T. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, p. 273–283, 2008.

KAMADA, Y. et al. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. **Genes Dev**, v. 9, n. 13, p. 1559-71., jul 1995.

KATAOKA, T. et al. Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. **Cell**, v. 37, n. 2, p. 437-45, jun 1984.

KETELA, T.; GREEN, R.; BUSSEY, H. Saccharomyces cerevisiae mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. **J Bacteriol**, v. 181, n. 11, p. 3330-40, jun 1999.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, fev 2006.

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

KRYSAN, D. J. et al. Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in Saccharomyces cerevisiae. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1364-74, ago 2005.

KUCHIN, S.; VYAS, V. K.; CARLSON, M. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 12, p. 3994-4000, jun 2002.

KUGE, S. et al. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 18, p. 6139-50, set 2001.

KURANDA, K. et al. Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1147-66, set 2006.

LAIZÉ, V. et al. Molecular and functional study of AQY1 from Saccharomyces cerevisiae: role of the C-terminal domain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 1, p. 139-44, abr 1999.

LEVIN, D. E. Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69, n. 2, p. 262-91, jun 2005.

LEVIN, D. et al. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the S. cerevisiae cell cycle. **Cell**, v. 62, n. 2, p. 213-24, jul 1990.

LIU, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, v. 66, n. 4, p. :807-15, ago 1991.

LIU, X. D.; THIELE, D. J. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. **Genes Dev**, v. 10, n. 5, p. 592-603, mar 1996.

LUSSIER, M. et al. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 435-50, out 1997.

MAO, C. et al. Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. **J Biol Chem**, v. 275, n. 40, p. 31369-78, out 2000a.

MAO, C. et al. Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 10, p. 6876-84, mar 2000b.

MARKS, V. et al. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 1, p. 35-52, fev 2008.

MARTIN, H. et al. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. **Mol Gen Genet**, v. 241, n. 1-2, p. 177-84, out 1993.

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J**, v. 15, n. 9, p. 2227-35, maio 1996.

MAZUR, P. et al. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 10, p. 5671-81, out 1995.

MENTRÉ, P. et al. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 45, n. 3, p. 353-62, maio 1999.

MENTRÉ, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. **Int Rev Cytol**, v. 201, p. 1-84, 2001.

MOLINA-GARCÍA, A. D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 19, p. 3-54, 2002.

MONTEIRO, P. T. et al. YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p. D132-6, jan 2008.

MORAIS, P. B. et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugarcane aguardente. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 13, n. 2, p. 241-3, jan 1997.

MOTSHWENE, P. et al. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v. 377, n. Pt 3, p. 769-74, fev 2004.

NIKKO, E.; PELHAM, H. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. **Traffic**, v. 10, n. 12, p. 1856-67, dez 2009.

OP DEN KAMP, J. A. Lipid asymmetry in membranes. **Annu Rev Biochem**, v. 48, p. 47-71, 1979.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 207-33, abr-jun 1998.

OZAKI, K. et al. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 15, n. 9, p. 2196-207, maio 1996.

PALHANO, F. L. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 50, n. 4, p. 447-57, jun 2004a.

PALHANO, F. L.; ORLANDO, M. T.; FERNANDES, P. M. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 233, n. 1, p. 139-45, abr 2004b.

PARAVICINI, G. et al. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 4896-905, nov 1992.

PARROU, J. L.; TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, n. Pt 6, p. 1891-900, jun 1997.

PEDRUZZI, I. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. **EMBO J**, v. 19, n. 11, p. 2569-79, jun 2000.

PERKINS, T. J.; SWAIN, P. S. Strategies for cellular decision-making. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 326, nov 2009.

PEVSNER, J. **Bioinformatics and functional genomics**. 2<sup>a</sup>. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell., 2009.

PROCOPIO, S.; QIAN, F.; BECKER, T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. **Eur Food Res Technol**, v. 233, p. 721–729, 2011.

PROFT, M. et al. genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1343-52, ago 2005.

QUINN, P. J.; JOO, F.; VIGH, L. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 53, n. 2, p. 71-103, 1989.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011. ISBN ISBN 3-900051-07-0.

REISER, V.; RUIS, H.; AMMERER, G. Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 4, p. 1147-61, abr 1999.

ROMAN, H. Development of yeast as an experimental organism. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH J.R. **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces**: Life Cycle and Inheritance. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981.

ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 830-5, mar 1991.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-101, fev 2001.

RUTTER, J. et al. PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 8991-6, jul 2001.

SAHARA, T.; GODA, T.; OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 50015-21, dez 2002.

SALDANHA, A. J. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3246-8, nov 2004.

SALES, K. et al. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. **Biochim Biophys Acta**, v. 1463, n. 2, p. 267-78, fev 2000.

SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, n. 1, p. 253-82, mar 2006.

SANTIAGO, T. C.; MAMOUN, C. B. Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38723-30, out 2003.

SANZ, M. et al. Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 5, p. 1183-95, mar 2002.

SCANDALIOS, J. **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 34, 1997.

SCHERRER, R.; LOUDEN, L.; GERHARDT, P. Porosity of the yeast cell wall and membrane. **J Bacteriol**, v. 118, n. 2, p. 534-40, maio 1974.

SCHORLING, S. et al. Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3417-27, nov 2001.

SCHÜLLER, C. et al. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. **EMBO J**, v. 13, n. 18, p. 4382-9, set 1994.

SEYMOUR, I. J.; PIPER, P. W. Stress induction of HSP30, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. **Microbiology**, v. 145, n. Pt 1, p. 231-9, jan 1999.

SHIMOI, H. et al. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. **J Bacteriol**, v. 180, n. 13, p. 3381-7, jul 1998.

SIDOUX-WALTER, F.; PETTERSSON, N.; HOHMANN, S. The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqy1 is involved in sporulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 50, p. 17422-7, dez 2004.

SMITH, A. E. et al. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 18, p. 9871-4, ago 2000.

SMITH, T. L.; RUTTER, J. Regulation of glucose partitioning by PAS kinase and Ugp1 phosphorylation. **Mol Cell**, v. 26, n. 4, p. 491-9, maio 2007.

SMOOT, M. E. et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 431-2, fev 2011.

SORGER, P. K. Heat shock factor and the heat shock response. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 363-6, maio 1991.

STRASSBURG, K. et al. Dynamic transcriptional and metabolic responses in yeast adapting to temperature stress. **OMICS**, v. 14, n. 3, p. 249-59, jun 2010.

SWAN, T.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiol Lett**, v. 169, n. 1, p. 191-7, dez 1998.

TACHIBANA, C. et al. Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 6, p. 2138-46, mar 2005.

TANGHE, A. et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 12, p. 5981-9, dez 2002.

TARASSOV, K. et al. An in vivo map of the yeast protein interactome. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1465-70, jun 2008.

TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Adv Food Res**, v. 30, p. 1-76, 1986.

TEIXEIRA, M. C. et al. The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res**, v. 34, p. D446-51, jan 2006.

TEIXEIRA, M. C.; MIRA, N. P.; SÁ-CORREIA, I. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 22, n. 2, p. 150-6, abr 2011.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 319-26, jun 2005.

TERASHIMA, H. et al. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet**, v. 264, n. 1-2, p. 64-74, set 2000.

TESTE, M. A. et al. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Mol Biol**, v. 10, p. 99, out 2009.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-90, dez 1994.

THEVELEIN, J. M.; DE WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 904-18, set 1999.

TOH-E, A. et al. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. **Yeast**, v. 9, n. 5, p. 481-94, maio 1993.

TOONE, W. M.; JONES, N. Stress-activated signalling pathways in yeast. **Genes Cells**, v. 3, n. 8, p. 485-98, ago 1998.

TROTT, A.; MORANO, K. A. The yeast response to heat shock. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. 2<sup>a</sup>. ed. Alemanha: Springer, 2003. p. 71-119.

VAN DER REST, M. E. et al. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 2, p. 304-22, jun 1995.

VAN DER VAART, J. et al. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 177, n. 11, p. 3104-10, jun 1995.

VAN DIJKEN, J.; SCHEFFERS, W. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol Lett**, v. 32, n. 3-4, p. 199–224, abr 1986.

VICENTE, M. A. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit. **Int J Food Microbiol**, v. 108, n. 1, p. 51-9, abr 2006.

VYAS, V. K. et al. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 11, p. 1882-91, nov 2005.

WANG, Y. et al. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. **PLoS Biol**, v. 2, n. 5, p. E128, maio 2004.

WARNER, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 11, p. 437-40, nov 1999.

WEBER, G.; DRICKAMER, H. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. **Q Rev Biophys**, v. 16, n. 1, p. 89-112, fev 1983.

WELKER, S. et al. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. **Mol Cell**, v. 39, n. 4, p. 507-20, ago 2010.

WILCOX, L. J. et al. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. **J Biol Chem**, v. 277, n. 36, p. 32466-72, set 2002.

WINDERICKX, J. et al. From feast to famine; Adaptation to nutrient availability in yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. 2. ed. Alemanha: Springer, 2003. p. 305-386.

YALE, J.; BOHNERT, H. J. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 15996-6007, maio 2001.

YAN, C.; LEE, L. H.; DAVIS, L. I. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. **EMBO J**, v. 17, n. 24, p. 7416-29, dez 1998.

YOSHIMOTO, H. et al. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 31079-88, ago 2002.

YOUNG, E. T. et al. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p. 26146-58, jul 2003.

YOUNG, M. E. et al. The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 3, p. 927-34, fev 2002.

YUN, D. et al. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 13, p. 7082-7, jun 1997.

ZAMAN, S. et al. Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 245, 2009.

ZHANG, N.; OLIVER, S. G. The transcription activity of Gis1 is negatively modulated by proteasome-mediated limited proteolysis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 9, p. 6465-76, fev 2010.

ZHENG, Z.; ZOU, J. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem.** 2001 Nov 9;276(45):41710-6. Epub 2001 Sep 5., v. 276, n. 45, p. 41710-6, nov 2001.

ZHOU, H.; WINSTON, F. NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genet**, v. 2, p. 5, 2001.

ZLOTNIK, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **J Bacteriol**, v. 159, n. 3, p. 1018-26, set 1984.

## 7.- ANEXOS

**Anexo 1** -Valores de expressão dos genes induzidos relacionados com a parede celular e membrana plasmática nos diferentes tempos pós-tratamento com alta pressão hidrostática.

Gene	ORF	Descrição	Tempo pós-HHP			
			0'	5'	10'	15'
<i>AQY1</i>	YPR192W	Canal de água esporo-específico que medeia o transporte de água através da membrana	2,39	1,16	2,05	0,02
<i>CSR2</i>	YPR030W	Proteína nuclear proposta como reguladora da endocitose de proteínas da membrana plasmática	1,81	2,06	1,7	1,16
<i>CWP1</i>	YKL096W	Manoproteínas do exterior da célula e sua deleção causa um aumento na sensibilidade por alguns compostos químicos	0,31	1,59	1,57	3,55
<i>ECM38</i>	YLR299W	Enzima degradadora de glutatona	1,89	2,06	2,63	3,03
<i>FMP45</i>	YDL222C	Proteína requerida para esporulação e para manutenção do conteúdo de esfingolipídios	-0,04	2,92	2,84	4,22
<i>GPD1</i>	YDL022W	Enzima chave para síntese de glicerol	2,4	3,65	3,79	3,9

<i>GPT2</i>	YKR067W	Envolvido na acilação de glicerol-3-fosfato e diidroxiacetona na biossíntese de lipídeos	1,89	2,45	2,55	2,81
<i>GUT2</i>	YIL155C	Envolvido na utilização de glicerol	1,84	2,31	2,43	2,83
<i>HSP12</i>	YFL014W	Proteína envolvida na manutenção da membrana em condições de estresse	1,34	6,45	7,36	7,84
<i>HSP30</i>	YCR021C	Chaperona da família das proteínas de choque térmico	1,26	3,34	3,46	-0,79
<i>OSW2</i>	YLR054C	Gene requerido para os últimos passos na síntese da parede do esporo	1,15	1,14	1,54	0,55
<i>PDR11</i>	YIL013C	Envolvido na captação de esterol	2,59	0,56	0,53	1,24
<i>PIR3</i>	YKL163W	Proteína requerida para estabilidade da parede celular	-0,4	1,73	2,57	4,23
<i>PST1</i>	YDR055W	Proteína que contém um sitio de ancoragem a GPI	-0,55	-0,21	0,65	2,93
<i>RAS2</i>	YNL098C	Proteína ligante de GTP	1,4	2,43	2,82	3,16
<i>ROM1</i>	YGR070W	Proteína trocadora GDP/GTP para Rho1p	1,97	3,27	3,81	3,68

<i>SDP1</i>	YIL113W	Fosfatase dual-especifica que regula negativamente Slt2p	2,14	3,83	4,31	5,49
<i>SHC1</i>	YER096W	Proteína requerida para síntese de quitosano	1,89	2,11	2,39	0,78
<i>STF2</i>	YGR008C	Atua na regulação da sintetase mitocondrial F1F0-ATP	2,28	3,79	4,25	5,29
<i>TFS1</i>	YLR178C	Envolvido com a inibição de Ira2p, regulador negativo de RAS	1,18	2,9	3,94	4,68
<i>TPK2</i>	YPL203W	Codifica a isoforma da subunidade catalítica de PKA	2,13	3,22	3,27	3,25
<i>YPC1</i>	YBR183W	Catalisa tanto a degradação quanto a síntese de fitoceramida	2,03	2,82	2,84	2,72

---

**Anexo 2** – Valores de expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática nos tratamentos de 50 MPa por 30 min e 40 MPa por 16 h (IWAHASHI et al., 2003).

Gene	ORF	Descrição	HHP 50MPa por 30min	HHP 40 MPa por 16 h
<i>AGP1</i>	YCL025C	Aminoácido permease de baixa afinidade com uma gama ampla de substrato, envolvido na captação de glutamina, asparagina, e outros aminoácidos	3,03	-0,94
<i>CRH1</i>	YGR189C	Quitina transglicosilase que funciona na transferência de quitina de beta (1-6) e (1-3) beta glucanos na parede celular	-0,19	2,82
<i>DIP5</i>	YPL265W	Permease aminoácido dicarboxílico, medeia de alta afinidade e de alta capacidade de transporte de L-glutamato e L-aspartato	4,16	-3,22
<i>GIT1</i>	YCR098C	Permease da membrana plasmática, medeia a absorção de glycerophosphoinositol e glycerophosphocholine como fontes de nutrientes de inositol e fosfato	2,88	1,44
<i>GLC3</i>	YIL136W	Proteína de função desconhecida, maior constituinte da membrana externa da mitocôndria	3,68	-0,03
<i>GLN1</i>	YPR035W	Glutamina sintetase, sintetiza glutamina a partir de glutamato e de amônia	3,56	1,58

<i>GPH1</i>	YPR160W	Glicogenio-fosforilase, não essencial, necessária para a mobilização do glicogênio, a atividade é regulada por fosforilação mediada por AMP cíclico, a expressão é regulada pelos elementos resposta ao estresse e pela via cinase MAP HOG	2,81	1,39
<i>GSY1</i>	YFR015C	Glicogênio sintase com semelhança com Gsy2p, o homólogo de levedura mais expressos	5,2	-0,6
<i>GSY2</i>	YLR258W	Glicogênio sintase, semelhante ao Gsy1p; expressão induzida por limitação da glicose, de nitrogênio, pelo choque de alta temperatura e pela fase estacionária	2,36	0,46
<i>HSP150</i>	YJL159W	Proteína de choque térmico que é secretada e covalentemente ligado à parede celular através de beta-1,3-glucano pontes e dissulfureto	0,02	2,69
<i>MEP1</i>	YGR121C	Permease de amonia	3,26	-0,38
<i>PHM7</i>	YOL084W	Proteína de função desconhecida, a expressão é regulada por níveis de fosfato	3,22	0,72
<i>PIR1</i>	YKL164C	Proteína necessária para a estabilidade da parede celular	-3,54	2,09
<i>PIR3</i>	YKL163W	Proteína necessária para a estabilidade da parede celular	-0,4	3,58
<i>PST1</i>	YDR055W	Proteína que contém um sitio de ancoragem a GPI	-0,55	4,42
<i>PUT4</i>	YOR348C	Permease de prolina, necessária para o transporte de alta afinidade de prolina	2,71	0,67

<i>SED1</i>	YDR077W	Glicoproteína de parede estrutural das células em fase estacionária células, possível papel na manutenção do genoma mitocondrial	-0,09	2,79
<i>SEO1</i>	YAL067C	Putativa permease, membro da subfamília transportador allantoate da superfamília principal facilitador	3,15	1,21
<i>SLT2</i>	YHR030C	Serina/ treonina-quinase MAP; envolvidas na regulação da manutenção da integridade da parede celular, a progressão através do ciclo celular, e retenção do mRNA nuclear em estado de choque de calor	-0,15	3,11
<i>TIP1</i>	YBR067C	Maior parede celular manno-proteína com a atividade da lipase possível	-0,49	2,33
<i>YPS3</i>	YLR121C	Protease aspártica, membro da família yapsin de proteases envolvidas no crescimento e manutenção da parede celular	-0,09	2,49
<i>YRO2</i>	YBR054W	Proteína de função desconhecida com semelhança com rhodopsins arqueas	2,81	0,47

---

**Anexo 3**– Valores de expressão dos genes relacionados à parede celular e à membrana plasmática nos tratamentos de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente de 15min e 40 MPa por 16 h (IWAHASHI et al., 2003).

Gene	ORF	Descrição	HHP 50 MPa por 30min +0,1 MPa por 15 min.	HHP 40 MPa por 16 horas
<i>AGP1</i>	YCL025C	Aminoácido permease de baixa afinidade com uma gama ampla de substrato, envolvido na captação de glutamina, asparagina, e outros aminoácidos	-2,23	-0,94
<i>BPT1</i>	YLL015W	Transportador transmembranar do tipo ABC, encontrado em membrana vacuolar, envolvido no transporte de bilirrubina não conjugada e na desintoxicação de metais pesados através conjugados de glutathione, juntamente com Ycf1p	3,25	0,32
<i>CRH1</i>	YGR189C	Quitina transglicosilase que funciona na transferência de quitina de beta (1-6) e (1-3) beta glucanos na parede celular	0,22	2,82
<i>ECM38</i>	YLR299W	Enzima degradadora de glutathione	3,03	0,32
<i>ECM4</i>	YKR076W	Glutathiontransferase	4,08	1,59

<i>ERG25</i>	YGR060W	codifica a C-4 metil esterol oxidase que catalisa o primeiro passo para remover dois grupos C-4 metil na biossíntese de ergosterol	0,15	2,17
<i>GDB1</i>	YPR184W	Enzima glicogênio desramificadora contendo glucanotransferase e alfa-1,6-amiloglicosidase atividades, necessárias para a degradação do glicogênio	3,95	1,2
<i>GLC3</i>	YEL011W	Proteína de função desconhecida, maior constituinte da membrana externa da mitocôndria	6,18	-0,03
<i>GLG1</i>	YKR058W	Iniciador da síntese de glicogênio	4,01	0,39
<i>GNP1</i>	YDR508C	Glutamina permease de alta afinidade , também transporta Leu, Ser, Thr, Cys, Met e Asn	-2,28	-0,42
<i>GPH1</i>	YPR160W	Glicogenio-fosforilase, não essencial, necessária para a mobilização do glicogenio, a atividade é regulada por fosforilação mediada por AMP cíclico, a expressão é regulada pelos elementos resposta ao estresse e pela via cinase MAP HOG	6,08	1,39
<i>GPT2</i>	YKR067W	Envolvido na acilação de glicerol-3-fosfato e diidroxiacetona na biossíntese de lipídeos	2,81	-0,42
<i>GSY1</i>	YFR015C	Glicogênio sintase com semelhança com Gsy2p, o homólogo de levedura mais expressos	6,68	-0,6

		Glicogeniosintase, semelhante ao Gsy1p; expressão induzida por		
<i>GSY2</i>	YLR258W	limitação da glicose, de nitrogênio, pelo choque de alta temperatura e pela fase estacionária	4,92	0,46
		Transportador de glicose de baixa afinidade, a expressão é induzida por		
<i>HXT1</i>	YHR094C	Hxk2p na presença de glicose e reprimido pela Rgt1p quando a glicose é limitante	-3,31	-1,49
		Transportador de glicose de alta afinidade, a expressão é induzida por		
<i>HXT2</i>	YMR011W	níveis baixos de glicose e reprimido por elevados níveis de glicose	-4,07	-4,3
		Transportador de glicose de alta afinidade, a expressão é induzida por		
<i>HXT4</i>	YHR092C	níveis baixos de glicose e reprimido por elevados níveis de glicose	-2,91	-2,18
		Transportador de glicose de alta afinidade, a expressão é induzida por		
<i>HXT6</i>	YDR343C	níveis baixos de glicose e reprimido por elevados níveis de glicose	-2,99	-1,44
		Transportador de glicose de alta afinidade, a expressão é induzida por		
<i>HXT7</i>	YDR342C	níveis baixos de glicose e reprimido por elevados níveis de glicose	-2,77	-2,33
		Proteína de membrana envolvida na homeostase de íons de zinco,		
<i>IZH1</i>	YDR492W	membro da família IZH	-4,82	0,85
		Proteína de membrana envolvida na homeostase de íons de zinco,		
<i>IZH4</i>	YOL101C		-5,15	-0,36

## membro da família IZH

<i>MCR1</i>	YKL150W	Redutase mitocondrial b5 NADH-citocromo, envolvida na biossíntese de ergosterol	3,74	0,54
<i>MET1</i>	YKR069W	Proteína envolvida com a síntese de siroheme, grupo prostético utilizado na enzima sulfito redutase para reduzir sulfito a sulfeto	-0,72	2,13
<i>MYO3</i>	YKL129C	Um dos dois tipo I miosinas	2,43	-0,12
<i>OLE1</i>	YGL055W	Desaturase de ácido graxo	-4,21	0,51
<i>OPI3</i>	YJR073C	Fosfolípidometiltransferase, catalisa os dois últimos passos na biossíntese de fosfatidilcolina	1,93	3,75
<i>PHM7</i>	YOL084W	Proteína de função desconhecida, a expressão é regulada por níveis de fosfato	5,66	0,72
<i>POX1</i>	YGL205W	Codifica uma enzima envolvida na beta-oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos	0,66	2,8
<i>PST1</i>	YDR055W	Proteína que contém um sitio de ancoragem a GPI	2,93	4,42
<i>RLM1</i>	YPL089C	Fator de transcrição MADS-box, componente da proteína quinase C mediada via da MAP quinase envolvido na manutenção da integridade celular	-0,52	2,24

<i>SDP1</i>	YIL113W	Fosfatase dual-especifica que regula negativamente Slp2p	5,49	0,7
<i>SED1</i>	YDR077W	Glicoproteína de parede estrutural das células em fase estacionária células, possível papel na manutenção do genoma mitocondrial	2,55	2,79
<i>SGA1</i>	YIL099W	Glicoamilase intracelular esporo-específica envolvida na degradação de glicogênio	2,4	1,64
<i>SLT2</i>	YHR030C	Serina/ treonina-quinase MAP; envolvidas na regulação da manutenção da integridade da parede celular, a progressão através do ciclo celular, e retenção do mRNA nuclear em estado de choque de calor	1,59	3,11
<i>SPI1</i>	YER150W	Proteínas da parede celular GPI-ancoradas envolvida na resistência ácido fraco	2,94	0,77
<i>STF2</i>	YGR008C	Atua na regulação da sintetase mitocondrial F1F0-ATP	5,29	1,21
<i>THI7</i>	YLR237W	Transportador de membrana responsável pela captação de tiamina	-3,71	-0,25
<i>TIP1</i>	YBR067C	Maior mannosproteína da parede celular com possível atividade lipase	-0,95	2,33
<i>VMR1</i>	YHL035C	Proteína de membrana vacuolar envolvido na resistência a múltiplas drogas e sensibilidade de metal	2,99	0,54
<i>YCR061w</i>	YCR061W	Proteína de função desconhecida	2,83	0,46

<i>YEH1</i>	YLL012W	Envolvida na homeostase de esterol	-2,35	1,29
<i>YGR149w</i>	YGR149W	Proteína de função desconhecida	3,27	1,71
<i>YPC1</i>	YBR183W	Catalisa tanto a degradação quanto a síntese de fitoceramida	2,72	0,19
<i>YRO2</i>	YBR054W	Proteína de função desconhecida com semelhança com rhodopsinsarqueas	5,2	0,47
<i>ZRT1</i>	YGL255W	Transportador de alta afinidade de zinco da membrana plasmática, responsável pela maioria de absorção de zinco	-3,78	-1,43

---