

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de pós-graduação em biotecnologia

Lucas Ferreira da Silva

Análise da expressão temporal de genes relacionados ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta ao estresse por alta pressão hidrostática

Vitória – ES
2012

Lucas Ferreira da Silva

Análise da expressão temporal de genes relacionados ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta ao estresse por 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 como parte dos requisitos a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Vitória – ES

2012

Lucas Ferreira da Silva

Análise da expressão temporal de genes relacionados ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta ao estresse por 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 como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Fernanda Bravim
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Wangel e Iracema
e aos meus irmãos, Vangel, Denison e Débora

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patricia M. B. Fernandes, pela sua orientação colaborativa durante esses dois anos, que sempre me motivou e me fez refletir com os seus inúmeros ensinamentos. Agradeço a chance dada por ela, de conhecer e me apaixonar pelo estudo do estresse e das leveduras.

Ao Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes por depositar sua confiança em um “forasteiro”. Agradeço-o pelos seus inúmeros incentivos, e pela colaboração em prol da realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. James R. Broach e a Dr. Soyeon Lippman da Universidade de Princeton, por contribuírem enormemente na realização dos experimentos de microarranjo.

A todos os amigos de laboratório, especialmente; Diego Trindade de Souza, pela companhia de todas as horas; Fernanda Bravim , pela enorme paciência e colaboração; Érica Dutra, por suas infinitas sugestões e David Buss pela amizade e colaboração.

Aos Professores de graduação, Sandra Lauton, Anderson Chavez, Ronaldo Alvim e Sabina Maura , por indicarem caminhos, por contribuírem na lapidação de meus pensamentos e na ampliação de minha perspectiva sobre ciência e pesquisa.

À minha querida e amada namorada Alessandra Suriani Martins, muito obrigado pela compreensão da distancia, apoio, incentivo, amor e carinho a mim concedidos.

Aos amigos e companheiros que me trazem esperança, especialmente Vangel Ferreira, Gustavo Henrique, Valéria Alves, David Dias, Thiago Ramos, Mariana Alves e Elenice Belotti.

As agencias de fomento, FINEP, CNPq, CAPES, FAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que permitiram tanto a minha permanência no estado do Espírito Santo, como o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1-INTRODUÇÃO	16
1.1-A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	16
1.2-O estresse.....	17
1.3-.....	19
Estresse por choque térmico	19
1.4-Estresse por alta pressão hidrostática	20
1.5-Regulação da resposta ao estresse	22
1.6-Modificações no metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante o estresse.	24
1.7-A tecnologia do microarranjo	26
1.8-.....	27
Bioinformática	27
1.9-Redes Biológicas	28
2-OBJETIVO GERAL.....	30
2.1- Objetivos específicos.....	30
3-MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1.- Linhagens utilizadas, condições de crescimento e tratamento de pressão.....	31
3.2.- Análise de microarranjo.....	31
3.2.1.- Extração do mRNA	31
3.2.2.- Normalização dos dados	32
3.2.3.- Implementação computacional	33
3.3.- Confirmação dos dados de microarranjo por RT-PCR em tempo real	36
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1-Perfil global da expressão gênica 0, 5, 10 e 15 minutos após o tratamento com alta pressão hidrostática.	39
4.2-Avaliação da expressão dos genes ligados a glicólise e gliconeogênese após o tratamento com a alta pressão hidrostática.	50
4.3-Análise das redes de funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares.....	58

4.4-Busca por fatores de transcrição ligados a mudança transcricional temporal.....	62
4.5-Identificação de elementos regulatórios nos genes que possuem expressão imediatamente após a pressurização e repressão nos tempos posteriores.....	66
4.6-Rede de motivos de DNA e mRNA compartilhados entre os genes diferencialmente expressos após o piezotratamento.....	68
4.6-Validação dos experimentos de microarranjo por RT-PCR em tempo real	72
5-CONCLUSÃO	73
6-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados como primers na reação de RT-PCR em tempo real.	38
Tabela 2 Processos biológicos atribuídos a cada ramo por meio da busca de termos (GO)	65
Tabela 3 Busca por motivos reguladores no DNA e RNA de genes com a transcrição diminuída a partir de 5 minutos após o piezotratamento	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Boxplot mostrando a expressão de todos os genes nos tratamentos de 0, 5, 10 e 15 minutos após a aplicação de 50 MPa por 30 minutos. Os grupos são representados por : (1) biogênese de componentes celulares(2)ciclo celular(3)diferenciação celular(4) proteção celular (5) diferenciação do tipo celular(6)comunicação celular (7) transporte celular(8) desenvolvimento (9) metabolismo energético (10) interação com o meio (11) metabolismo (12) dobramento, modificação e transporte de proteínas(13)síntese protéica(14)proteínas com funções estruturais ou catalíticas(15)regulação do metabolismo(16) transcrição(17) elementos de transposição (18) não classificados41

Figura 2 Comparação dos genes ligados a proteção celular no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria proteção celular. Os pontos em azul representam todos os outros genes.....43

Figura 3 Comparação dos genes ligados ao Metabolismo energético no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria Metabolismo energético. Os pontos em azul representam todos os outros genes.....46

Figura 4 Comparação dos genes ligados ao Metabolismo no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria Metabolismo. Os pontos em azul representam todos os outros genes.47

Figura 5 Comparação dos genes ligados a síntese protéica no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria de síntese protéica. Os pontos em azul representam todos os outros genes.....49

Figura 6 Via glicolítica de *S.cerevisiae* imediatamente após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.....51

Figura 7Via glicolítica de *S.cerevisiae* 15 minutos após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.....51

Figura 8 Via bioquímica da biosíntese e catabolismo de trealose. (A) perfil da via imediatamente após o tratamento por 30 minutos com 50MPa.(B) perfil da via 15 minutos após o tratamento por 30 minutos com 50MPa. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão

- reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.....54
- Figura 9 Via bioquímica do ciclo do ácido cítrico 15 minutos após o tratamento por 30 minutos com 50MPa. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.....57
- Figura 10 Principais termos relacionados aos genes induzidos imediatamente após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. A intensidade das cores demonstra a significância estatística dos termos e o tamanho do nodo mostra a quantidade de genes relacionados com o termo.59
- Figura 11 Principais termos relacionados aos genes induzidos 15 minutos após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. A intensidade das cores demonstra a significância estatística dos termos e o tamanho do nodo mostra a quantidade de genes relacionados com o termo.60
- Figura 12 Identificação dos pontos de bifurcação 5, 10 e 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática (50 MPa por 30 minutos). Os braços formados demonstram grupos gênicos que se diferenciaram à medida que o tempo aumentava. As bifurcações são indicadas pela atribuição de novas cores aos braços. Em alguns braços foram identificados fatores de transcrição que estão relacionados ao comportamento dos grupos gênicos. O tamanho de cada círculo está relacionado a distribuição normal da expressão dos genes que aquele grupo possui.64
- Figura 13 Rede regulatória de motivos de DNA e mRNA. Os círculos em azul representam motivos de DNA e mRNA compartilhados entre os genes diferencialmente expressos após o tratamento com a alta pressão hidrostática. Os grupos de genes que compartilham as mesmas funções biológicas ou processos moleculares são representados com a cor vermelha. As letras A e B representam os dois diferentes módulos encontrados na rede.....70
- Figura 14 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 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.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR = Região 3' não traduzida

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 = Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESR = Resposta ao estresse ambiental

GABA= Ácido gama-aminobutírico

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^+ = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

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

PCR = Reação em cadeia da polimerase

pH = Potencial hidrogeniônico

RNA = Ácido ribonucléico

rpm = Rotação por minuto

RT = Transcriptase reversa

STRE = Elementos de resposta ao estresse

YEPD = Extrato de lêvedo, peptona dextrose

RESUMO

Os organismos vivos mantêm um complexo equilíbrio interno, que os possibilita controlar seu crescimento e executar suas funções biológicas, porém, flutuações nas condições ambientais podem afetar essa harmonia que é indispensável para a existência da vida. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo modelo unicelular e eucarioto. Entre os processos biotecnológicos que essa levedura é utilizada, pode-se destacar a produção de pão, queijos, bebidas alcoólicas, combustíveis e fármacos. Do ponto de vista fisiológico, todos esses processos afetam o funcionamento normal dessas leveduras. Sendo de extrema importância o estudo dos mecanismos moleculares que gerem proteção contra essas situações estressantes. Um dos modelos utilizados no estudo de estresse é a alta pressão hidrostática. A alta pressão hidrostática é conhecida por causar alterações morfológicas e metabólicas nas leveduras. Vários estudos têm demonstrado que o padrão de expressão dos genes de leveduras submetidas à alta pressão hidrostática exibe um complexo perfil, uma vez que, durante a resposta ao estresse por pressurização, as leveduras expressam genes de resposta ao estresse oxidativo, osmótico, térmico, dentre outros. Nesse estudo, células da linhagem selvagem, BT0605, de *S. cerevisiae* foi submetida ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos. Após isso, foram analisados com o uso do microarranjo, os valores de expressão de todos os seus genes imediatamente após o tratamento e 5, 10 e 15 minutos após o piezotratamento. A análise de microarranjo, juntamente com outras ferramentas de bioinformática, demonstrou que os genes ligados ao metabolismo dessas leveduras são altamente afetados pelo tratamento com a alta pressão hidrostática. Além disso, observou-se que desde o momento da retirada da pressão até 15 minutos após o tratamento, genes da glicólise, respiração celular, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, tiveram um padrão crescente de expressão. A comparação dos dados referentes a expressão dos genes ligados a síntese protéica, metabolismo e proteção celular em células pressurizadas e em células submetidas ao choque térmico, possibilitou a descoberta de genes diferencialmente expressos apenas pelo tratamento com a alta pressão hidrostática. Estas análises comparativas evidenciaram a importância dos genes relacionados à síntese de metionina na adaptação das células a ambientes com alta pressão hidrostática, bem como, o possível envolvimento do fator de transcrição Cbf1 na regulação desses genes.

Observou-se ainda a indução de genes responsáveis por metabolizar uma diversidade de compostos que minimizam os efeitos deletérios da alta pressão hidrostática nas proteínas, tais como, prolina, trealose, glicerol e metionina. A indução de genes ligados a produção de GABA (ácido gama-amino butirico) e a redução do NADP⁺ sugerem que a biossíntese de compostos antioxidantes seja crucial para a tolerância ao piezotratamento. A busca por motivos controladores, no DNA e RNA, nos vários genes induzidos ou reprimidos durante a pressurização, demonstrou que diferentes elementos controladores podem promover tanto a indução, como o decaimento dos transcritos dos genes diferencialmente expressos, após o piezotratamento.

Palavras-chave: Levedura, piezotratamento, barotolerância, microarranjo, bioinformática, expressão temporal.

ABSTRACT

Living organisms maintain a complex internal balance, which enables them to optimise their growth and metabolism. However, fluctuations in environmental conditions can affect this balance. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular, eukaryote model organism. The biotechnological processes it is used for include the production of bread, cheese, alcohol, drugs and pharmaceuticals. From a physiological standpoint, all these processes affect the normal operation of the cell and it is extremely important to study the molecular mechanisms that provide protection against these stressful situations. One of the models used to study stress is high hydrostatic pressure (HHP), which is known to cause morphological and metabolic changes in yeast. Several studies have demonstrated that the expression pattern of genes from yeast submitted to high hydrostatic pressure shows a complex profile, including genes related to oxidative, osmotic, and heat protection.

In this study, cells of the *S. cerevisiae* strain BT0605 were exposed to HHP (50 MPa) for 30 minutes and then returned to ambient pressure. Gene expression was assessed by microarray immediately after HHP treatment and 5, 10 and 15 minutes thereafter. Microarray analysis, along with other bioinformatics tools, showed that genes associated with metabolism are highly affected by the treatment by HHP. During the 15 minutes after HHP, genes involved in glycolysis, carbohydrate and amino acid metabolism and cellular respiration showed increasing levels of expression.

Comparison of gene expression data from pressurized cells and cells subjected to heat shock, showed genes related to protein synthesis, metabolism and cell protection differentially expressed only under pressure stress. These comparative analyzes showed the importance especially of genes related to methionine synthesis in cellular adaptation to high hydrostatic pressure, as well as the possible involvement of transcription factor Cbf1 in regulating these genes.

Expression of genes responsible for metabolizing a variety of compounds that minimize the deleterious effect of HHP on proteins, such as proline, trehalose, glycerol and methionine, was increased. The induction of genes linked to the production of GABA (gamma amino butyric acid) and the reduction of NADP⁺ suggests that the biosynthesis of antioxidant compounds is important in

piezotolerance. The search for controlling motifs in DNA and RNA, in several genes induced or repressed during pressurization, found different controlling elements which may be associated with the induction or the decay of transcripts of genes differentially expressed after pressure treatment.

Palavraschave: yeast, piezotreatment, barotolerance, microarrays, bioinformatics, temporal expression.

1-INTRODUÇÃO

1.1-A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular e eucarioto que possui forma oval e seu tamanho pode variar entre 5 e 10 micrómetros. Essa levedura pertence à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoidea.

A *S.cerevisiae* é considerada um organismo modelo de extrema importância para o estudo dos eucariotos. Seu genoma já está totalmente seqüenciado e várias análises comparativas mostraram que muitos de seus mecanismos como a replicação do DNA, divisão celular, recombinação e metabolismo, possuem alto grau de conservação em relação a outros organismos eucariotos, como por exemplo, de humanos. Essa levedura possui 16 cromossomos lineares contendo 12 Mb de bases nitrogenadas e aproximadamente 6000 orfs. Essas células podem ser encontradas vivendo tanto em uma forma haplóide como diplóide. A *S.cerevisiae* possui ciclo de vida curto, é de fácil cultivo e manipulação genética, além de possuir um vasto banco de dados que disponibiliza milhares de informações sobre o comportamento desse organismo em vários níveis.

Uma vasta quantidade de processos biotecnológicos feitos nos dias de hoje e, também por nossos ancestrais, a milhares de anos atrás, utilizam esse organismo como catalisador. Várias são as serventias dessa levedura para os humanos. Dentre suas utilidades podemos destacar a produção de pão, queijos, bebidas alcoólicas, combustíveis, fármacos e etc. Entre todos os processos anteriormente citados, talvez o mais interessante economicamente, seja a produção do etanol em larga escala, nas grandes indústrias.

A *S.cerevisiae* quando crescida em meio com alta concentração de glicose sofre uma característica inibição na via do ácido tricarboxílico e da cadeia transportadora de elétrons, através de um mecanismo conhecido como, “*Crabtree effect*”. Essa repressão faz com que a obtenção de ATP dessas células seja exclusivamente por meio da fermentação alcoólica, liberando assim grande quantidade de etanol e CO₂ (THOMSON et al.,2005). Durante a fase lag de crescimento das leveduras, grande

quantidade de açúcar é consumida, porém os compostos nitrogenados, principalmente derivados de amônia, tem o consumo evitado, com isso a população das células pode aumentar rapidamente (MARIA et al.,2003).

Durante o efeito *Crabtree*, as células desviam o piruvato formado na glicólise para rotas fermentativas (VAN DIJKEN et al.,1993). A rota fermentativa em leveduras possui duas enzimas. A primeira é a piruvato descarboxilase (Pdc1p), que converte piruvato em acetaldeído e CO₂. A segunda enzima da fermentação se chama álcool desidrogenase (*ADH1* e *ADH2*) e trabalha na redução do acetaldeído a etanol, com a concomitante redução do NADH.

O etanol formado nesse processo se difunde através da membrana plasmática para o meio de crescimento, e o NAD⁺ formado é disponibilizado para o metabolismo glicolítico. O gene *ADH1* é superexpresso durante o crescimento em glicose, devido a ativação dos fatores transcricionais Rap1 e Gcr1(SANTANCELO et al.,1990). A expressão da isoenzima *ADH2* e, conseqüentemente, a utilização do etanol é controlada pelo fator de transcrição Adr1 (que é também responsável pela utilização de glicerol e ácidos graxos como fonte de carbono).

O acetaldeído formado pela Pdc1p é também essencial durante o crescimento em glicose. Sendo que o acetil-CoA citosólico é uma molécula muito importante na disponibilização de precursores para a formação de ATP, lipídios e aminoácidos.

1.2-O estresse

Os organismos vivos mantêm um complexo equilíbrio interno, que os possibilita controlar seu crescimento e executar suas funções biológicas porém, flutuações nas condições ambientais podem afetar esse equilíbrio que é indispensável para a existência da vida. O estresse consiste nas perturbações internas ou externas que desestabilizam a dinâmica de crescimento de um organismo. O estresse é um fenômeno limitante na vida dos seres vivos, porém, os organismos não são passivos às situações estressantes, eles evoluíram fisiologicamente e geneticamente para se protegerem e sobreviverem a flutuações na temperatura, osmolaridade, acidez, radioatividade, altas concentrações de substâncias tóxicas e ausência de nutrientes.

A resposta a uma situação de estresse não depende apenas das mudanças na fisiologia e bioquímica interna da célula, elas dependem também da velocidade com que a nova perturbação é percebida e interpretada. (GASH et al.,2000).

Vários autores demonstraram que o tratamento prévio com uma fonte de estresse sub-letal, pode aumentar a sobrevivência das células que, subseqüentemente, serão expostas a valores letais desse, ou de outro tipo de estresse. Esse interessante fenômeno é real para várias situações estressantes, e é conhecido como, proteção cruzada (DRAUZIO, 2010). Em trabalhos prévios do nosso grupo foi demonstrado que células tratadas previamente com H₂O₂, etanol e baixas temperaturas, sobreviveram e tornaram-se mais resistentes aos tratamentos com a alta pressão hidrostática, e que células pré-tratadas com valores baixos de pressão hidrostática, apresentaram maior sobrevivência, quando submetidas a valores de pressão letais. Essas observações sugerem que existam mecanismos de resposta ao estresse que são comuns a vários tipos de perturbações, e que o fenômeno da proteção cruzada estimula uma pré-ativação de componentes importantes para a resposta a outros estresses posteriormente aplicados (AMIR.,2009).

A dorna de fermentação é um ambiente causador de múltiplo estresse nas leveduras. Situações como o aumento de temperatura, estresse oxidativo e estresse osmótico são decorrentes das várias reações exotérmicas que acontecem em grandes concentrações de açúcar no interior das dornas (PAUL,1997). O controle dessas condições desfavoráveis é essencial para uma boa fermentação, porem, existe uma grande dificuldade em se controlar essas mudanças que ocorrem nas dornas, principalmente por parte dos pequenos produtores de bebidas. Várias leveduras, incluindo a *S. cerevisiae* são adaptadas às condições ambientais presentes em uma dorna de fermentação. Sendo essas leveduras capazes de crescer a 37°C, em meio com 50% de glicose e 8% de etanol. Porem, essas variáveis em uma dorna de fermentação podem facilmente ultrapassar esses valores (PATARO et al.,1998). Por esse motivo é muito interessante que as leveduras usadas em processos industriais, como a fermentação e em várias outras aplicações biotecnológicas, sejam resistentes a uma vasta gama de estresses.

1.3-Estresse por choque térmico

O aumento de temperatura ocorre em várias partes do globo terrestre, e também no interior das dornas de fermentação, e este aumento, pode afetar bruscamente o metabolismo celular dos organismos. No caso da dorna de fermentação, as mudanças no funcionamento da bioquímica das leveduras produzem efeitos indesejáveis, uma vez que o mosto de fermentação altera suas propriedades químicas e organolépticas em função desses microrganismos (FLEET; HEARD, 1993).

A resposta ao estresse em leveduras tem sido amplamente estudada a nível genômico. As mudanças causadas durante uma situação estressante implicam em bruscas alterações no perfil de expressão de genes e proteínas das células (CAUSTON et al.,2006). Muito da compreensão dos mecanismos de resposta vem do estudo do choque térmico, em que as células crescidas a uma temperatura de 28°C são posteriormente transferidas para temperaturas acima de 33°C.

O choque térmico é uma resposta altamente conservada em todos os organismos, de humanos a leveduras e pode ser induzido por insultos proteotóxicos extremos. Esse alto grau de conservação entre diferentes eucariotos sugere que a resposta ao choque térmico seja de extrema importância para a sobrevivência em meios estressantes (AKERFELT et al.,2010).

Em 1970 foi mostrado que de cromossomos politenos de *Drosophila melanogaster* surgiam estruturas com imensa quantidade de alças laterais, chamadas de *puffs* cromossômicos, e que nessas estruturas aconteciam uma robusta ativação de genes codificando as mais diversas proteínas de choque térmico (*HSP heat shock proteins*)(LINDQUIST et al.,1986).

O choque térmico é controlado a nível genético por vários elementos regulatórios de ação cis, chamados de elementos de choque térmico (*HSEs heat shock elements*), que estão presentes em várias cópias acima do sítio de início da transcrição dos genes de resposta ao choque térmico (PELHAM,1982). Em leveduras, a resposta ao choque térmico é feita pelos fatores transcricionais Hsf1 e Msn2/Msn4, que são responsáveis pela ativação de vários genes que codificam proteínas que desempenham papéis como dobramento, tráfego e maturação de proteínas, e paralelamente, também inibem a síntese de genes relacionados a vários elementos

da biogênese de ribossomos (TROTT; MORANO, 2003). Apesar das HSPs serem chamadas de proteínas de choque térmico, elas estão presentes em uma gama de estresses e herdaram esse nome por terem sido primeiramente observadas na resposta ao choque térmico (*DE MAIO*, 1999; *SCHLESINGE*, 1990).

Em resposta ao choque térmico, também é bem documentada a formação de moléculas de carboidratos como o glicogênio e a trealose que atuam como protetores contra o estresse (*MAHMUD et al.*,2009). A trealose já foi associada ao controle da progressão do ciclo celular, proteção contra a desidratação, estresse osmótico, congelamento, calor e proteção contra substâncias tóxicas, tais como o etanol, radicais livres e metais pesados (*THEVELEIN*, 1993), além de evitar a agregação de proteínas e de preservar a integridade das membranas biológicas (*LUCERO et al.*, 2000). O glicogênio providencia uma rápida mobilização nas fontes de carbono no momento em que as leveduras estão se adaptando a uma nova condição de crescimento, para isso, a degradação do glicogênio é acompanhada da formação de esterol, que é essencial para o sucesso da fermentação e viabilidade das leveduras (*PRETORIUS*, 2000; *FRANCOIS et al*, 1997). Essas duas moléculas usam a glicose como precursores de sua síntese e dependem da entrada de açúcares na célula para que sejam sintetizadas. Outras modificações importantes nas células submetidas ao choque térmico é a fluidificação nas membranas, que pode levar a desintegração na bicamada lipídica (*DMITRY;NORIO*, 2004).

1.4-Estresse por alta pressão hidrostática

A pressão é definida com uma força por unidade área, aplicada em uma dada superfície. Matematicamente a equação abaixo pode explicar este estresse:

$$P = F / A \text{ [equação 1]}$$

Onde, P representa a pressão, F representa a força normal aplicada àquela superfície e A é a área da superfície. A alta pressão hidrostática é um tipo de pressão estática, em que o mesmo valor de pressão pode ser mantido por um longo tempo. Na categoria de pressão estática, a pressão hidrostática é considerada uma pressão isostática, em que os valores de pressão são os mesmos em todas as direções do espaço (*NOLWENNIG; JEAN*, 2002).

Em diferentes pontos do planeta Terra podemos encontrar grandes variações na pressão atmosférica. Por exemplo, o ambiente em que nós humanos vivemos, possui valor de pressão de, aproximadamente, 1 atmosfera, o que equivale a 0,1 megapascal (MPa). Porém, a maioria da nossa biosfera é composta por locais onde os valores de pressão são extremamente elevados. Nesses locais, podemos encontrar organismos piezófilos ou barófilos, que geralmente suportam ambientes como o fundo oceânico, que em determinados pontos apresenta pressões que excedem 38 MPa.

Sobreviver em ambientes com valores de pressão elevados implica em drásticas mudanças na fisiologia e bioquímica dos organismos. A alta pressão hidrostática diminui o volume de reação das células, o que leva a alteração de diversos componentes celulares de maneira a favorecer conformações mais compactas. (MENTRÉ et al., 1999). Componentes como a membrana plasmática sofrem compactação em seus lipídeos, principalmente, nos lipídeos próximos a proteínas que estão inseridas na membrana (REYES; Tauc, 1993). Esse fenômeno contribui para uma maior fluidez e aumento na espessura da membrana. Essas mudanças também afetam a difusão de moléculas pela membrana e comprometem a função das proteínas membranares. Já foi demonstrado que algumas proteínas podem sofrer mudanças conformacionais e funcionais quando submetidas a pressões menores que 20 MPa (MOLINA; SANZ, 2002), essas mudanças ocorrem devido a capacidade da pressão de desestabilizar ligações fracas (como as pontes de hidrogênio), que tem um importante papel na estabilização da forma terciária das proteínas (BALNY et al, 2002). Uma resposta diferente para explicar as mudanças conformacionais causada nas proteínas é a entrada de água em suas cavidades. Acredita-se que esse efeito seja o mais deletério para as proteínas que são submetidas a altas pressões hidrostáticas, uma vez que, a exposição de resíduos hidrofóbicos a solventes polares cause um forte desarranjo e, conseqüentemente perda das funções proteicas (SILVA; FOGUEL, 2009; HEREMANS, 2005).

A estrutura lipídica de uma célula é o componente mais sensível a ação da alta pressão hidrostática (WINTER; JEWORREK, 2009). A diminuição da fluidez das células causada pelo piezotratamento já foi relacionada com a sensibilidade ao tratamento com a alta pressão hidrostática (YALDAGARD et al., 2008). O piezotratamento pode modificar o aspecto das membranas de líquido-cristalino para

um aspecto gelatinoso. Sendo que os organismos que vivem em altas pressões hidrostáticas tendem a apresentar membranas mais fluidas. Essa fluidez é parcialmente um reflexo do aumento da taxa de lipídios insaturados em suas membranas (WINTER; JEWORREK, 2009).

As leveduras quando submetidas a alta pressão hidrostática, sofrem vários danos em suas organelas. Entre esses danos, podemos evidenciar a desestabilização que as estruturas das mitocôndrias sofrem. Altos valores de pressão podem causar a liberação no citocromo C que existe no interior mitocondrial, e alguns autores supõem que essa liberação do citocromo C, atue como um sinalizador chave para a indução de um processo apoptótico (BRUL et al, 2000). Além das alterações nas mitocôndrias, a pressão pode enfraquecer a interação entre proteínas e DNA e favorecer a dissociação de importantes complexos protéicos (LIMA et al, 2000; AERTSEN et al, 2009).

Várias são as aplicações da pressão hidrostática na biociência, entre essas aplicações destacamos a descontaminação de alimentos (TAUSCHER, 1995), inativação de microrganismos (SATILMIS; SENCER, 2011), germinação de sementes (XUNCHENG et al, 2008), mudanças na cinética e função de enzimas (BANG; CHUNG, 2010) e produção de vacinas (SHEARER; KNIEL, 2009). Além dessas utilidades, a alta pressão hidrostática tem sido utilizada como um importante modelo do estudo da resposta ao estresse, indicando linhagens de leveduras com importantes características industriais

1.5-Regulação da resposta ao estresse

Em resposta a estímulos do meio, a quantidade de transcritos de uma grande parte do genoma das células é alterada, seja aumentando ou diminuindo seus níveis (SCOTT et al, 2000). O aumento na quantidade de mRNA pode ser resultado do aumento da taxa de transcrição ou pela diminuição da taxa de degradação, contudo, a diminuição nos níveis dos transcritos podem ser alterados pelo aumento na taxa de degradação ou pelo decréscimo em sua taxa de produção (OPHIR et al, 2008). Além disso, os fatores pós-transcricionais podem atuar juntamente com os fatores de transcrição para controlar a expressão dos genes. Em leveduras, vários fatores de transcrição que participam da ativação de centenas de genes já foram

identificados. Alguns desses fatores de transcrição estão relacionados à ativação de grupo de genes para respostas a estresses específicos, enquanto outros estão relacionados a elementos comuns a uma ampla variedade de estresses (ESTRUCH, 2000).

Já é bem demonstrado que mecanismos complexos de regulação por meio de fatores de transcrição são mediados por uma densa rede de interações que originam determinados padrões que podem induzir ou reprimir a expressão gênica em determinadas condições ambientais (TARASSOV ET AL, 2008).

As mudanças nos níveis transcricionais que acontecem após a aplicação de um estresse, já são correlacionados com a mudança na síntese de proteínas. Usando a técnica do microarranjo, Kuhn et al., (2001) identificaram transcritos em leveduras que demonstraram associação alterada com os polirribossomos (polissomos) após as células serem trocadas de glicose para meio contendo glicerol. Evidenciando assim que a taxa de tradução pode ser alterada em função de modificações na transcrição celular.

A grande maioria das situações estressantes é capaz de induzir ou reprimir a transcrição de 10 a 14% de todos os genes de *Saccharomyces cerevisiae*. A maioria dos genes que sofrem indução na sua taxa de expressão estão envolvidos com o metabolismo de carboidratos, detoxificação de espécies reativas de oxigênio, dobramento de proteínas e autofagia. Os genes reprimidos são, geralmente, relacionados ao crescimento celular, incluindo ainda, o processamento de RNA, transcrição, tradução, biosíntese de nucleotídeos e ribossomos. Como demonstrou por *Gasch et al.*, (2000) ,esse perfil transcricional característico, que sempre surge no momento no qual a célula ume submetida ao estresse, é gerado pela expressão de alguns grupos gênicos que receberam o nome de *elementos de resposta ao estresse do meio* (ESR).

Um modulador muito importante para a resposta ao estresse é designado de elemento STRE , que é um elemento de regulação cis, com a sequencia 5' CCCCT , que se encontra em múltiplas cópias acima dos sítios de transcrição de, aproximadamente, 200 genes. Os elementos STRE possuem sítios que são reconhecidos por duas proteínas funcionalmente similares, Msn2p e Msn4p(SCHMITT; MCENTEE, 1996). Ambas as proteínas possuem um domínio de

ligação dedo de zinco em suas extremidades C terminais, que possibilita a ligação aos elementos STRE. Em momentos onde não existe nenhuma perturbação, Msn2p permanece no citoplasma, se movendo para o núcleo apenas com o surgimento de uma condição estressante (BOY-MARCOTTE et al., 1998).

Em trabalhos anteriores mostrando o perfil da expressão global de células submetidas ao tratamento de pressão de 200 MPa por 30 min, indicaram que 40 % dos genes com a expressão induzida após esse tratamento possuíam elementos STRE em suas regiões promotoras (FERNANDES et al, 2004).

O controle das respostas celulares ao estresse pode acontecer também a nível pós-transcricional. A expressão gênica pode sofrer regulação através de diversos mecanismos pós-transcricionais, que envolvem a regulação do transporte, tradução, e decaimento das moléculas de RNA mensageiro (SHEPARD et al., 2003; ARAVA et al., 2003; WANG et al, 2002). Em muitos casos a regulação pós-transcricional ocorre através de elementos presentes nos RNAs mensageiros que podem interagir com centenas de proteínas ligantes a RNA mensageiro, que são conhecidas como RBPs (RBPs; *RNA binding proteins*) (ANANTHARAMAN et al, 2002).

A resposta a vários estresses segue uma seqüência de prioridades, que devem ser ativadas em uma ordem temporal. A primeira linha de defesa consiste em ativar componentes com baixo peso molecular (ex: trealose), proteínas do sistema de reparo e chaperonas que são necessárias para a sobrevivência imediata. Ao mesmo tempo, a célula deve ativar o sistema de transdução de sinais, que então pode desencadear linhas de defesa secundárias, como a ativação de enzimas preexistentes e a indução transcricional de genes codificando fatores com função protetora (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 1996).

1.6-Modificações no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* durante o estresse.

Uma tarefa indispensável para a sobrevivência das células é manter uma fonte de energia viável. A glicose é a fonte de energia preferida de leveduras e, sob estresse, as células induzem vários genes que afetam o metabolismo de glicose. Em resposta ao estresse, o destino metabólico da glicose é dividido entre a síntese de trealose,

armazenamento de glicogênio, síntese de ATP e regeneração de NAPH pela via de troca das pentoses (GASCH, 2002).

Um dos componentes formados a partir do metabolismo da glicose é a trealose, um dissacarídeo constituído por uma ligação α -(1,1) entre as glicoses, e está envolvido com a estabilização de proteínas, prevenção da agregação de proteínas desoveladas, proteção contra dano oxidativo e, além disso é relacionada com a manutenção do fluxo normal da via glicolítica (DE VIRGILIO et al.,1994; BENAROUJ; GOLDBERG, 2001; THEVELEIN; HOHMANN, 1995). Outro destino importante da glicose durante o estresse é o armazenamento de glicose em forma de glicogênio. Essa rota anabólica desempenha um papel crucial na sobrevivência das células em respostas a uma ampla variedade de situações de estresse (FRANCOIS; PARROU, 2001). Os mecanismos de defesa ao estresse consomem grande quantidade de ATP, então é de se esperar que a expressão de componentes da respiração celular sejam induzidos durante as situações estressantes (GASCH, 2002).

Células de leveduras deletadas em Msn2p/Msn4p mostraram que menos de 10 % dos genes da via respiratória alteram seu padrão de expressão em função dessas deleções. Apesar de 70% dos genes da via respiratória possuírem elementos promotores para a ligação de Msn2p/Msn4p, os mecanismos de regulação parecem ser independentes desses reguladores. Os poucos fatores induzidos por elementos STRE, parecem ter o papel mais importante na defesa contra espécies reativas de oxigênio, do que na geração de ATP propriamente dita (GASCH et al. 2000) .

A beta oxidação de ácidos graxos em leveduras é feita através dos peroxissomos, e as unidades acetil resultantes são transportadas para as mitocôndrias onde abastecem o ciclo do ácido tricarboxílico (HETTEMA; TABAK, 200). Porém, não é comum encontrar a expressão modificada de genes ligados a estes processos durante a resposta ao estresse (GASCH, 2002).

Os ribossomos, proteínas, RNA transportadores e RNA ribossômicos têm suas taxas de metabolismo rapidamente afetadas após a aplicação de vários tipos de estresse. É estimado que durante o crescimento de leveduras sejam encontrados aproximadamente 200 mil ribossomos, sendo que a massa da parte protéica dos

ribossomos compreende 15% de toda a massa total de proteínas celulares (WARNER, 1999). Devido à elevada quantidade de elementos necessários para a sua formação, o metabolismo de ribossomos se torna a tarefa que mais drena energia celular para sua realização (JORGENSEN et al., 2004). Como demonstrado por estudos de microarranjo, genes relacionados a síntese de ribossomos estão entre os genes mais fortemente regulados em leveduras sob estresse (CAUSTON et al., 2006). Porém, esse evento não é surpreendente, uma vez que a resposta ao estresse demanda um alto gasto energético (GASCH, 2002).

1.7-A tecnologia do microarranjo

O microarranjo foi desenvolvido para permitir que a expressão de todos os genes de um determinado organismo seja detectada em um mesmo experimento. Esse tipo de abordagem holística pertence à genômica funcional, e tem influenciado muito o surgimento de novas áreas, como a biologia dos sistemas, que abandona a visão de componentes celulares individuais e foca no funcionamento dos seres vivos a partir das relações entre todos os genes, proteínas e metabolitos presentes em uma dada situação (DENNIS, 2006).

Um ensaio de microarranjo é feito através de um microchip que contém sequências de DNA aderidas a uma base, que pode ser de vidro, plástico ou nylon. Todos os genes de um organismo podem ser organizados em um espaço único da placa, que é chamado de *Spot*. Os transcritos de um organismo ou tecido são então extraídos, passam por uma reação de transcrição reversa, são amplificados e recebem a adição de uma sonda marcadora. Sabemos que o microarranjo é uma forma de quantificação relativa da expressão gênica, e para isso necessita da utilização de duas amostras diferentes para ser efetuada. A marcação das amostras é realizada através de sondas com fluorescência diferentes (na maioria dos casos cy3 e cy5 que fluorescem nas cores vermelha e verde, respectivamente). A detecção do sinal emitido por essas sondas fluorescentes é captada por um sofisticado equipamento de scanner e, logo após, os dados são importados para um computador, onde as medidas de fluorescência são analisadas e quantificadas, o que gera uma enorme matriz de dados contendo os valores de expressão gênica (REDIG, 2005).

1.8-Bioinformática

Os dados biológicos vêm sendo gerados em uma taxa fenomenal. Na década passada, juntamente com o avanço das novas tecnologias de seqüenciamento de DNA, presenciamos o número de nucleotídeos nos bancos de dados crescerem exponencialmente a cada ano (AERTSEN et al, 2009; MONYA, 2010). Essa grande quantidade de dados, fez florescer a necessidade de organização, manutenção, armazenamento e análise dessas informações, que é o papel desempenhado pela bioinformática. A bioinformática pode ser definida de várias formas. Chamarei aqui a bioinformática de uma fusão da matemática, computação e estatística que é utilizada na resolução de problemas de origem biológica.

Entre as várias aplicações da bioinformática podemos destacar algumas que merecem atenção especial, como a predição de produtos gênicos a partir de uma seqüência de DNA/RNA, alinhamento de seqüência, identificação de motivos conservados, predição de estruturas secundarias e terciarias, análises filogenéticas, correlação de padrões de expressão (LUSCOMBE et al., 2001) e a biologia executável (JASMIN; THOMAS, 2007).

A bioinformática tem tentado cada vez mais criar alternativas para coletar e organizar todos os dados presentes nas publicações, de forma que a comparação entre os dados obtidos por diferentes grupos de pesquisa possa ser facilmente efetuada. Uma iniciativa que surgiu nos últimos anos e que é de extrema importância é o *The Gene Ontology Project* (<http://www.geneontology.org/>), que tem como foco a padronização da representação de genes e produtos, independente da espécie ou do banco de dados. Essa abordagem separa cada gene por um termo, que pode representar sua localização celular, função molecular ou função biológica.

Um dos grandes gargalos da bioinformática ainda hoje é a quantidade de profissionais disponíveis no mercado. No Brasil, apesar de notarmos uma tendência ao crescimento, existem ainda poucos locais para a formação de mão de obra qualificada. Outra grande barreira é a dificuldade de se encontrar pessoas que tem experiência com as ciências exatas e as ciências biológicas e se interessem por essa nova área (CHEN et al, 2012).

1.9-Redes Biológicas

Não é justo descartar o enorme conhecimento que a visão reducionista nos trouxe sobre os componentes individuais dos seres vivos nesse último século, porém tem ficado cada vez mais claro que a maioria das funções biológicas pode acontecer de forma discreta e são extremamente resistentes a abordagens que restringem o foco em componentes individuais (HARTWELL et al, 2002;KITANO, 2002; OLTVA; BARABÁSI, 2002). Um desafio chave que encontramos agora é entender como a estrutura e a dinâmica da complexa teia intracelular de interações contribui para a estrutura e a função dos seres vivos (ALBERT-LÁSZLÓ; ZOLTÁN , 2004).

O comportamento de muitos sistemas complexos, desde a internet até as células, surge de uma orquestrada atividade de muitos componentes que se relacionam com os outros através de pares de interação. Em um nível alto de abstração, os componentes podem ser reduzidos a uma série de nodos que são conectados a outros nodos por meio de *links*. Sendo cada *link* o representante da interação entre dois componentes. O conjunto formado entre vários nodos e *links* é chamado de rede, ou em uma linguagem matemática formal de grafo (ALBERT-LÁSZLÓ; ZOLTÁN , 2004).

Apesar de para muitos parecer apenas uma representação gráfica, a topologia e os atributos de uma rede podem ser extremamente informativos para o entendimento das relações dos componentes presentes nela. As redes podem apresentar modelos de organização hierárquicos, randômicos ou *scale-free*. Esses modelos são determinados pelo padrão de conexão entre os diferentes nodos. Por exemplo, uma grande parte das redes de interação entre os componentes celulares seguem o modelo de organização *scale-free*, que obedece a uma lei de potência, que determina que a maioria das conexões feitas nas células são estabelecidas por menos de 20% dos componentes da rede (JEONG et al, 2001). Outras medidas de atributos como, a conectividade, a centralidade, o grau de distribuição e a modularidade dos nodos podem definir a importância de um determinado componente de uma rede. Uma prática bem útil nos estudos de redes é a identificação dos componentes que possuem o maior grau de conectividade, chamados de *hubs*. Os *hubs* podem indicar quais elementos afetam fortemente a topologia de uma rede, em termos biológicos, algumas proteínas sinalizadoras e alguns fatores de transcrição têm esse tipo de comportamento global e podem ser

muito informativos para vários tipos de investigações (COHEN; HAVLIN, 2003, EDWIN et al, 2007).

Desta forma o trabalho pretendeu utilizar o microarranjo aliado com as análises de bioinformática, para entender quais genes são importantes para as mudanças ocorridas no metabolismo de *S.cerevisae* em resposta ao estresse causado durante o piezotratamento.

2-OBJETIVO GERAL

Analisar por meio do microarranjo a resposta transcricional dos genes envolvidos com o metabolismo celular em células de *S.cerevisiae* submetidas ao estresse por alta pressão hidrostática.

2.1- Objetivos específicos.

Analisar o comportamento transcricional dos genes do metabolismo celular da levedura *S.cerevisiae* imediatamente após o tratamento de 50 MPa e 5, 10 e 15 minutos após o piezotratamento.

Validar os experimentos de microarray por meio de RT-PCR em tempo real

Identificar os fatores de transcrição que se relacionam com o comportamento de determinados grupos gênicos envolvidos com o metabolismo celular.

Predizer motivos de DNA e mRNA que se relacionam com os grupos gênicos diferencialmente expressos.

Comparar transcricionalmente o estresse causado pela alta pressão hidrostática com outras fontes de estresse já descritas na literatura.

3-MATERIAL E MÉTODOS

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

A linhagem selvagem, BT0605, anteriormente isolada de uma alambique, como descrito em Bravim et al. 2007 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 células 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 é uma adaptação de uma célula de pressão fabricada em aço de alta dureza desenvolvida por E. S. Itskevich, em 1962, no “*Institute for High Pressure Physics of the Russian Academy of Science*”. Esta célula está desenhada para pressurização de amostras em um meio líquido através de um pistão cilíndrico de Cobre-Berílio. Um manômetro manual foi utilizado para aplicar a pressão. A vantagem desta montagem é que após a pressurização, um conjunto de engrenagens mantém a pressão aplicada e a unidade pode ser removida.

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 minutos a 5°C, lavadas em água ultrapura e centrifugadas novamente, sendo o precipitado imediatamente congelado em N₂ líquido e mantido a -80°C até o momento da extração do RNA.

3.2.1.- Extração 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 e as amostras tratadas com a sonda Cyanina5-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 h 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 University MicroArray Database* (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/> [60].

Para seleção de grupos funcionais foi utilizado o arquivo de classificação fornecido pelo banco de dados do MIPS *ComprehensiveYeast Genome Database* (CYGD) (disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/>) [120], esse arquivo integrado com algoritmos feitos no R Project possibilitou a escolha dinâmica de grupos gênicos que se desejava analisar.

3.2.3.1.- Avaliação da expressão gênica

Para produção dos gráficos de expressão gênica foi necessário criar um software que selecionava classes gênicas e, em seguida, gerava os gráficos com base no valor de expressão de cada gene ou grupo de genes.

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 importantes desse tipo de análise é a robustez que ela apresenta. Chamamos de análise estatística robusta aquela que não se distorce na presença de valores *outliers*.

Além de demonstrar o perfil de cada classe, o boxplot também indica quais genes possuíram o comportamento mais anormal dentro de uma classe específica (*outliers*), o que fornece um importante ponto de partida para a procura de genes envolvidos no processo de resposta ao piezotratamento.

Para relacionar diferentes tipos de estresse, foi necessário criar 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 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 Gene Expression Omnibus (GEO) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> [122]. Os genes que possuíam ORFs duplicadas ou que possuíam dados corrompidos ou faltantes, em qualquer uma das duas análises, foram excluídos pelo programa.

3.2.3.2.- Visualização das vias metabólicas afetadas pelo tratamento com a alta pressão hidrostática.

Para visualizar os genes diferencialmente expressos nas suas respectivas vias metabólicas, utilizamos o banco de dados wikipathways disponível em <http://www.wikipathways.org>. Os arquivos correspondentes as vias metabólicas foram adquiridos via download e exportados para o programa cytoscape. Logo após, a tabela contendo as expressões gênicas dos tratamentos foram introduzidas e analisadas.

3.2.3.3.- Criação de redes de funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares.

A fim de comparar quais redes gênicas foram formadas a partir dos genes induzidos e reprimidos selecionamos todos os genes com expressão maior do que 2 e menor do que -2. Esses genes foram exportados para o software cytoscape, onde foram analisados com o plugin Bingo 2.44. O plugin “Bingo” 2.44 foi configurado para categorizar os grupos utilizando os termos com a significância de 0.01 e o repertório de termos foi o “GOslim yeast”. As redes foram organizadas no cytoscape pelo “Spring Embedded Layout”. A intensidade das cores contidas em cada nodo criado é definida pelo valor da significância do termo, sendo que as cores mais escuras indicam o maior grau de significância. As diferenças nos tratamentos foram computadas através da fusão dos elementos não compartilhados entre as duas redes. Para isso, foi utilizado o plugin “Advance Network Merge” disponibilizado no programa cytoscape.

3.2.3.4-Utilização do software DREM

Utilizamos o software DREM (Dynamic Regulatory Events Miner) para a busca de fatores de transcrição, que se relacionam com o aumento ou a diminuição da expressão de alguns grupos gênicos, em função do tempo após o tratamento. Esse software combina a série de dados da expressão gênica temporal com ferramentas de atribuição de termos e regressão logística (JASON et al., 2007). As tabelas contendo os valores de expressão de 0 a 15 minutos após o tratamento pela alta pressão hidrostática foram inseridas no software DREM e o programa foi executado com as opções default. Após esse processo, a escolha dos termos relacionados a cada nodo foi realizada utilizando os valores de significância menores que $<0,05$. A figura final foi gerada através do próprio programa DREM e os dados foram exportados para uma tabela contendo os fator(es) de transcrição relacionados a regulação de cada grupo gênico, juntamente, com os valores de significância de cada termo atribuído.

3.2.3.4 Criação de uma rede de regulação a partir da busca por motivos de DNA e RNA compartilhados entre os grupos gênicos diferencialmente expressos após o tratamento com a alta pressão hidrostática.

Os genes com valor de expressão maior que 2 e menor que -2 em qualquer um dos tratamentos (0, 5, 10 e 15 minutos após a pressurização) foram selecionados para uma pré-clusterização utilizando o plugin Bingo 2.44 da ferramenta cytoscape, sendo a configuração para a atribuição de termos a mesma utilizada no item 2.3.3. Os grupos gerados por essa análise foram submetidos a uma busca por motivos na ferramenta FIRE (Finding Informative Regulatory Elements), que pertence a plataforma IGET, disponível no endereço eletrônico <https://iget.c2b2.columbia.edu/>. Os motivos de DNA e RNA atribuídos a cada grupo gênico foram coletados e, a partir desses dados, foi criada uma matriz de adjacência que foi exportada para o software cytoscape para a criação da rede de regulação. O layout de visualização foi o “Spring Embedded Layout” e a imagem final foi editada com o uso de uma ferramenta de edição de imagens.

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. Os genes *TAF10* foram utilizados como genes 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 minutos a 4°C, lavadas em água ultrapura e centrifugadas novamente, sendo o precipitado imediatamente congelado em N₂ 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 *DNase RQ1 RNase-Free DNase* (PROMEGA, Madison, EUA) durante 30 min a 37°C. Para inativação da enzima, 1 µl de *stop solution* (20 mM 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 (100 mM), 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, 50°C por 50 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 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando-se por um ciclo de 95°C por 15 segundos. 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 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 (Tabela 2) 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 90 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	89.63
	Reverse, 5'TCAGCGGTAGCGTATTGTTG3'		
<i>ADH3</i>	Forward, 5'TATTCAAGCCGCCAAAATTC3'	185	90.70
	Reverse, 5'TAACCCATCGCAGTTGCATA3'		
<i>HSP26</i>	Forward, 5'ATGCTGGCGCTCTTTATGAT3'	95	98
	Reverse, 5'TTCTAGGGAAACCGAAACCA3'		
<i>PHM7</i>	Forward, 5'TTGGGGAATTGAACGAAGAG3'	180	88.54
	Reverse, 5'TCTTCTGGCGAGTAGCCAAT3'		
<i>ROM1</i>	Forward, 5'AAACAAGTGGCACCAACACA3'	166	93.38
	Reverse, 5'CATTCTTGGGATTGCTCGTT3'		
<i>RTN2</i>	Forward, 5'CGTGCTATCGACAGGATGAA3'	110	106.71
	Reverse, 5'GGTTTGGGGTGGGATAATCT3'		
<i>TAF10</i>	Forward, 5'GCTAGGCAGCTATTGCAAGG3'	129	98.40
	Reverse, 5'CAACAGCGCTACTGAGATCG3'		
<i>USV1</i>	Forward, 5'AACGACAGCAACAACACCAA3'	214	80.70
	Reverse, 5'CGGAGGAAAGGACGATATGA3'		
<i>YGP1</i>	Forward, 5'TGACGGTGGTTACTCTTCCA3'	49	87.26
	Reverse, 5'GAACGGCAGAACTCAAGGAG3'		
<i>YPS6</i>	Forward, 5'TGGGAGATGCTTTCCTTGTC3'	193	91.71
	Reverse, 5'TCCTGTTCCGATGGGACTAC3'		
<i>ZEO1</i>	Forward, 5'GCCCAAGATGTCCAACAAAA3'	167	89.43
	Reverse, 5'TTCGACACCATCAGCAATGT3'		

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-Perfil global da expressão gênica 0, 5, 10 e 15 minutos após o tratamento com alta pressão hidrostática.

No intuito de mostrar a perturbação transcricional causada às células de *S.cerevisiae* após o tratamento com a alta pressão hidrostática, foi utilizado um diagrama de Box e Whisker, que continha o nível de expressão dos genes apresentados em uma função logarítmica na base 2. Esse diagrama teve o intuito de indicar quais eram as mudanças ocorridas globalmente no perfil de expressão gênica das leveduras em 0, 5, 10 e 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática.

No diagrama mostrado na Figura 1, cada classe de genes é representada por um número específico. As classes foram definidas através do agrupamento proposto pela classificação funcional do banco de dados MIPS FunCat (ANDREAS et al, 2004).

A visão geral do gráfico demonstra como os genes relacionados ao metabolismo energético (9) são positivamente regulados desde o momento inicial pós-estresse. Sendo esse grupo o mais diferencialmente expresso dentre todos os outros grupos, em todos os tratamentos feitos. Outros grupos gênicos que possuem sua expressão perceptivelmente afetada são os dos genes ligados ao mecanismo de proteção celular (4), síntese proteica (13) e transcrição gênica (16).

Esse diagrama de expressão gênica possibilita observar que com o passar do tempo, o perfil de expressão se torna mais distante do perfil transcricional das células não tratadas, sugerindo que seja necessário um tempo maior que 15 minutos para que as células retornem ao estado inicial de homeostase. Uma evidencia para isso, é que, em 15 minutos após o tratamento encontramos genes que possuem efeitos críticos na inibição da síntese proteica e divisão celular ainda em forte estado de repressão. Nos dados anteriores do grupo (PALHANO et al, 2004) foi demonstrado que a taxa de gemulação de leveduras submetidas a esse mesmo valor de pressão torna-se igual a antes do tratamento apenas 120 minutos após a retirada da célula do meio estressante. Do momento pós-estresse e até 45 minutos depois podemos observar as taxas de gemulação reduzidas pela metade, sendo nos

50 minutos após o tratamento, o momento em que a célula inicia a retomada dos valores iniciais de gemulação.

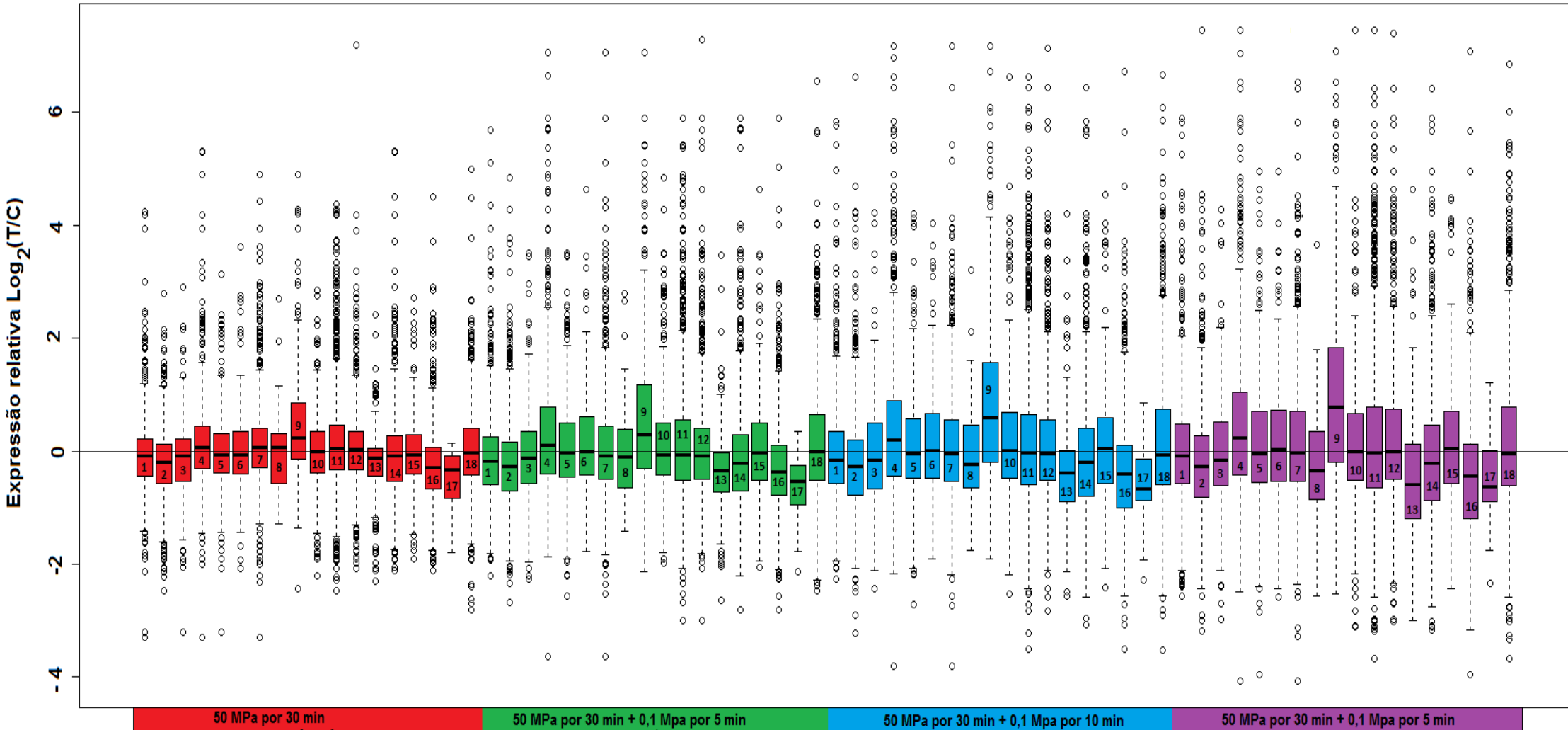


Figura 1 Boxplot mostrando a expressão de todos os genes nos tratamentos de 0, 5, 10 e 15 minutos após a aplicação de 50 MPa por 30 minutos. Os grupos são representados por : (1) biogênese de componentes celulares(2)ciclo celular(3)diferenciação celular(4) proteção celular (5) diferenciação do tipo celular(6)comunicação celular (7) transporte celular(8) desenvolvimento (9) metabolismo energético (10) interação com o meio (11) metabolismo (12) dobramento, modificação e transporte de proteínas(13)síntese protéica(14)proteínas com funções estruturais ou catalíticas(15)regulação do metabolismo(16) transcrição(17) elementos de transposição (18) não classificados

Inúmeros autores observaram que em células de levedura, os mesmos genes de resposta ao estresse são utilizados em grande parte das situações. Esses genes já foram nomeados como ESR (Environmental Stress Response ou Resposta ao Estresse Ambiental) e parecem ser regulados independentemente do tipo de estresse (BALL et al, 2000)

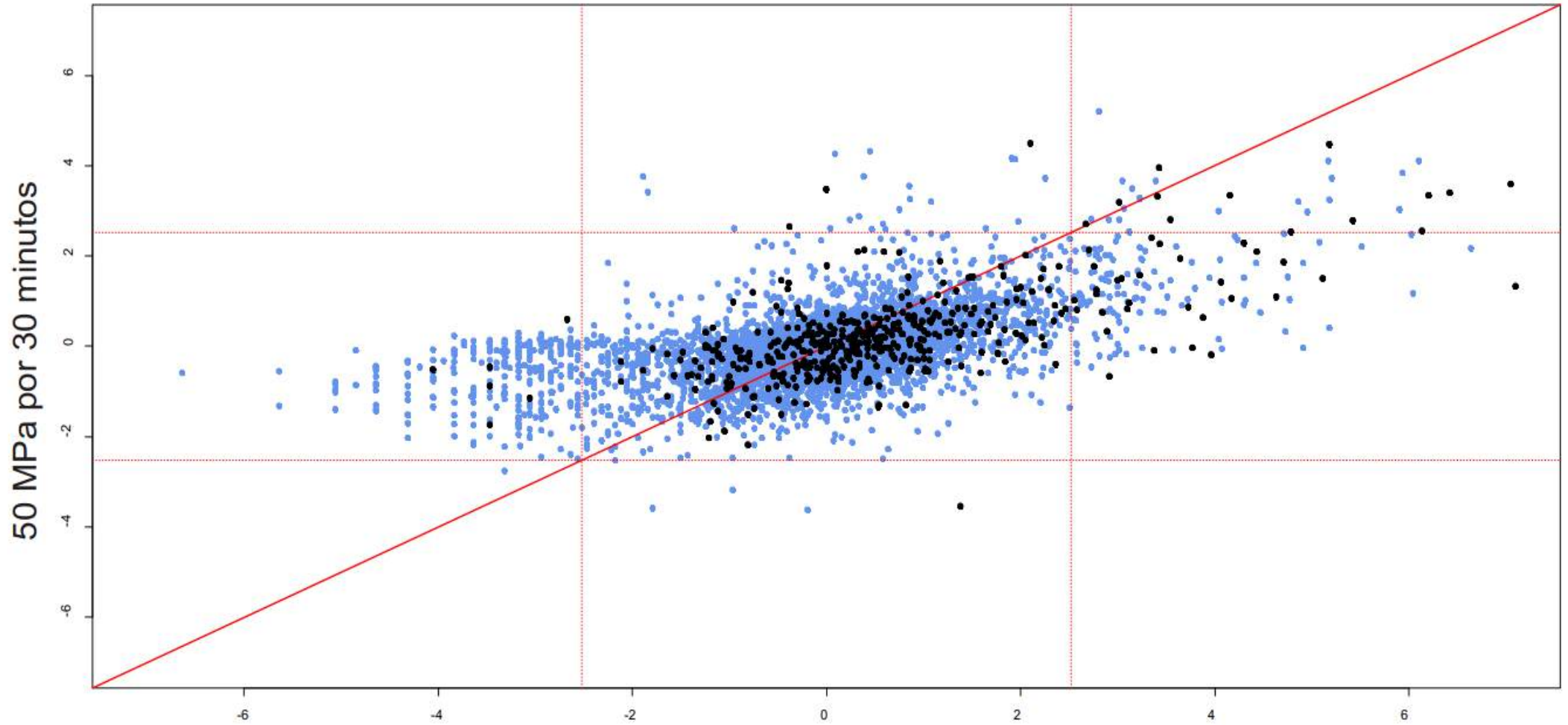
Essa grande quantidade de genes redundantes, ativados e desativados em diversas respostas, cria uma enorme dificuldade de se entender como a alta pressão hidrostática se diferencia em nível transcricional das respostas geradas por outras fontes estressantes.

Na tentativa de procurar mudanças singulares no perfil de expressão após o tratamento com a alta pressão hidrostática, escolhemos o estresse por choque térmico como um modelo de resposta comparativo. A escolha do choque térmico como parâmetro de comparação surgiu da observação de que células crescidas a 25°C e subsequentemente submetidas a um meio com temperatura elevada, apresentam suas taxas de sobrevivência semelhante ao tratamento com a alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 minutos (IWAHASHI et al, 1993).

O método utilizado para comparar os dois estresses foi a elaboração de um gráfico que continha em cada eixo os valores de expressão de um dos estresses. A primeira categoria de genes comparada foi a dos genes de *proteção celular*. Para essa análise o tratamento de 50 MPa por 30 minutos (tratamento imediatamente após a pressão) foi comparado com os dados gerados pela resposta ao estresse por choque térmico.

Na comparação da classe *proteção celular*, encontramos alguns genes que possuíam comportamento de expressão que se diferenciavam em ambos os estresses (Figura 2,). Genes como *GCY1*, *TPO4*, *TSA2*, *HSP12*, *PIR3*, *PIR1* e *SED1* estão reprimidos ou tem a expressão não alterada durante a resposta a alta pressão hidrostática, porém apresentam aumento durante o tratamento com o choque térmico. Todos os genes citados acima possuem ligação com a membrana citoplasmática ou parede celular, exceto *TSA2* que é uma tioredoxina citoplasmática, envolvida na defesa contra o estresse oxidativo (WONG et al., 2002).

Proteção celular



Choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos

Figura 2 Comparação dos genes ligados a proteção celular no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria proteção celular. Os pontos em azul representam todos os outros genes.

Após o tratamento com a alta pressão hidrostática, genes positivamente regulados como *CUP1-1*, ou genes que não apresentam variação no seu perfil de expressão após a pressurização, como *RAD59*, *YHB1*, *PHO3*, *LTV1*, *SRP40* e *KRI1* se encontram reprimidos no tratamento com o choque térmico.

Quando o procedimento anterior foi realizado para comparar os genes da classe de *metabolismo energético* (Figura 3), encontramos poucos elementos que se diferem nos dois tratamentos. O tratamento com alta temperatura foi quem apresentou genes que possuíam taxas de expressão maiores. O único gene do metabolismo energético induzido logo após a alta pressão hidrostática foi *GDH1*, que codifica a enzima glutamato desidrogenase, responsável por sintetizar glutamato, utilizando amônia e alfa-cetoglutarato como precursores (DELUNA et al., 2001)

A fim de entender um pouco mais as diferenças transcricionais existentes entre esses dois estresses, um grupo maior de genes denominado *Metabolismo* foi utilizado como parâmetro de comparação. No conjunto de genes definido como *Metabolismo*, se encontram vários genes responsáveis pelo anabolismo e catabolismo de aminoácidos, nucleotídeos e lipídios, além de genes ligados a produção de metabolitos secundários.

Notamos que após o tratamento com o choque térmico foi promovido um forte aumento transcricional no gene *TOR1*. O gene *TOR1* tem um importante papel no controle do crescimento celular durante uma situação de estresse. O gene *TKL2* que possui forte relação com a biosíntese de aminoácidos aromáticos e *ALD2* que possui envolvimento com a produção citoplasmática de alanina também foram fortemente induzidos após o choque térmico (Figura 4). Por outro lado, os genes da classe *Metabolismo* que sofreram modificações apenas após o piezotratamento, compartilham relações funcionais diretas com o aminoácido metionina. Podemos citar nesse conjunto, os genes *MET14*, *MET17* e *MHT1* que estão relacionados à biosíntese da metionina e de outros aminoácidos sulfurosos (MASSELOT; ROBICHON, 1975; THOMAS et al., 2000)

Com o intuito de medir a frequência em que os genes relacionados à metionina são positivamente regulados durante outros estresses, checamos centenas de situações

estressantes, utilizando para isso o banco de dados de microarranjos fornecido pelo trabalho de Gash et al., (2000). Essa análise mostrou que poucos foram os tratamentos que apresentavam esse mesmo conjunto de genes co-expressos. Os estresses que induziram esse grupo de genes, semelhantemente a alta pressão hidrostática, foram os tratamentos onde existia privação de nitrogênio, ausência de aminoácidos e estresse oxidativo induzido por diamida a concentrações de 1,5mM por 40 minutos.

O ponto interessante no aparecimento dos genes de metionina após o piezotratamento é que trabalhos anteriores já haviam demonstrado que leveduras crescendo em uma pressão hidrostática de 40 MPa por 16 horas (IWAHASHI et al .,2003) possuem sua lista de genes mais expressos, inúmeros representantes do metabolismo de metionina e aminoácidos sulfurosos.

Uma avaliação minuciosa no padrão de expressão temporal dos genes que possuem envolvimento com a síntese de aminoácidos sulfurosos e metionina mostrou que em 5 minutos pós-pressão, grande parte desses genes anteriormente expressos já não são mais regulados. Essas informações sugerem que a indução desse grupo possa estar ligada ao mecanismo de adaptação das células submetidas a alta pressão hidrostática. O que fortalece essa hipótese é que estes genes não são comuns a todos os estresses e são ativados apenas no momento em que a levedura está submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática.

A última comparação entre o piezotratamento e o choque térmico foi feita com os grupos gênicos relacionados à transcrição e síntese proteica (Figura 5). Nessa análise percebemos que os dois tratamentos se comportaram de forma bastante distinta. A resposta transcricional da célula submetida à alta temperatura mostrou possuir uma característica repressora muito potente quando comparada a alta pressão hidrostática. A maioria dos genes reprimidos nessas categorias pertence às famílias RPL e RPS, que estão ligados ao surgimento de subunidades dos ribossomos e envolvidos em processos traducionais. Sabemos que a maquinaria necessária para a realização da síntese proteica tem um custo extremamente elevado, sendo o processo biológico mais caro energeticamente para uma célula (PAUL et al., 2004).

Metabolismo energético

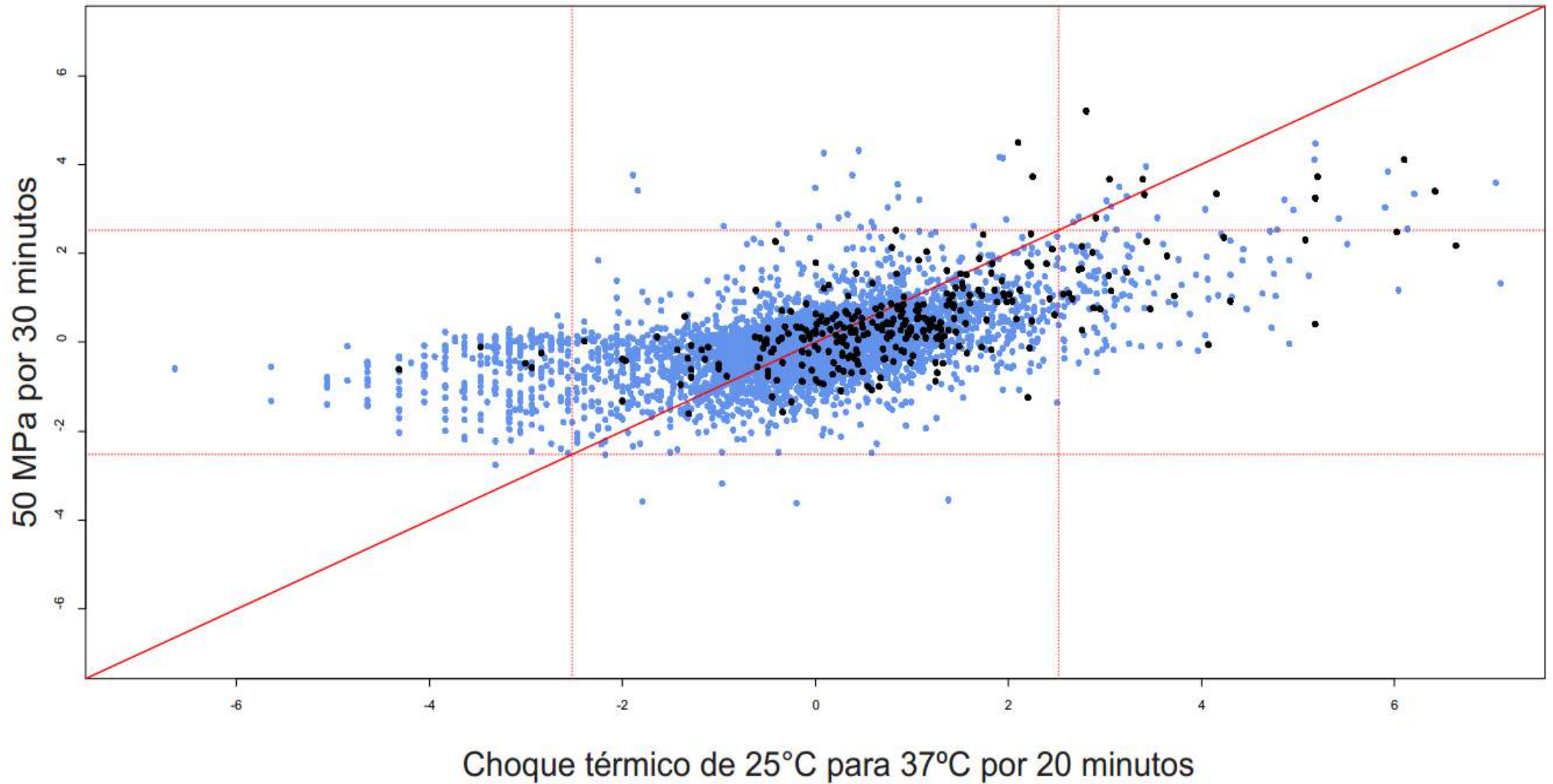


Figura 3 comparação dos genes ligados ao Metabolismo energético no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria Metabolismo energético. Os pontos em azul representam todos os outros genes.

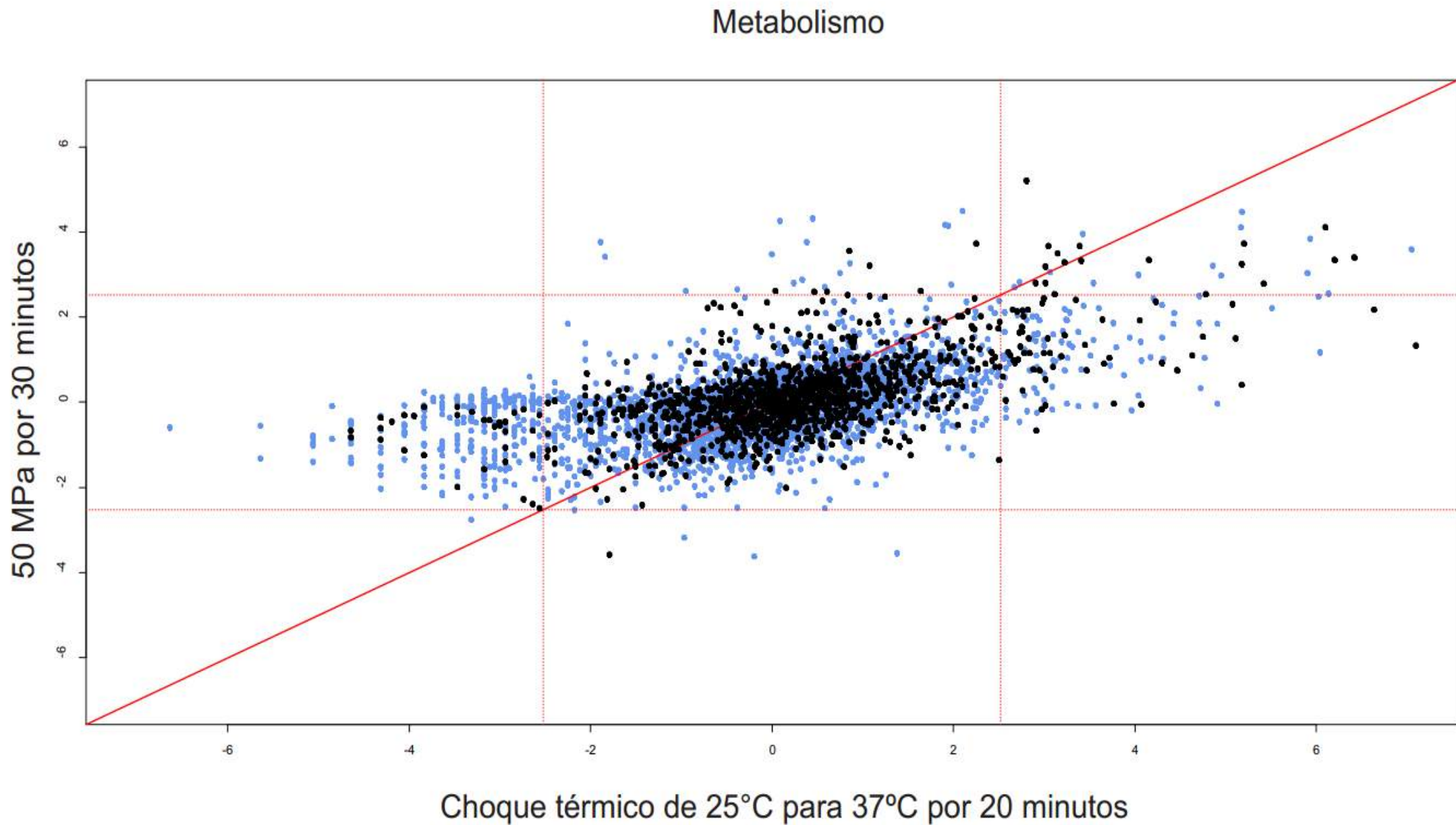


Figura 4 Comparação dos genes ligados ao Metabolismo no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria Metabolismo. Os pontos em azul representam todos os outros genes.

Como já foi estimado, a levedura *S.cerevisiae* é um organismo que não possui uma história evolutiva diretamente relacionada a ambientes com alta pressão hidrostática. Além disso, notamos que o padrão de repressão dos genes de parada do ciclo celular só se comparam semelhante aos genes do choque térmico 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática.

Acreditamos que a falta de uma coevolução com o estresse de alta pressão, diminui claramente a possibilidade da existência de uma sinalização específica de parada rápida do ciclo celular, como a que acontece na resposta a alta temperatura (RABOY et al ., 1999).

Síntese Protéica

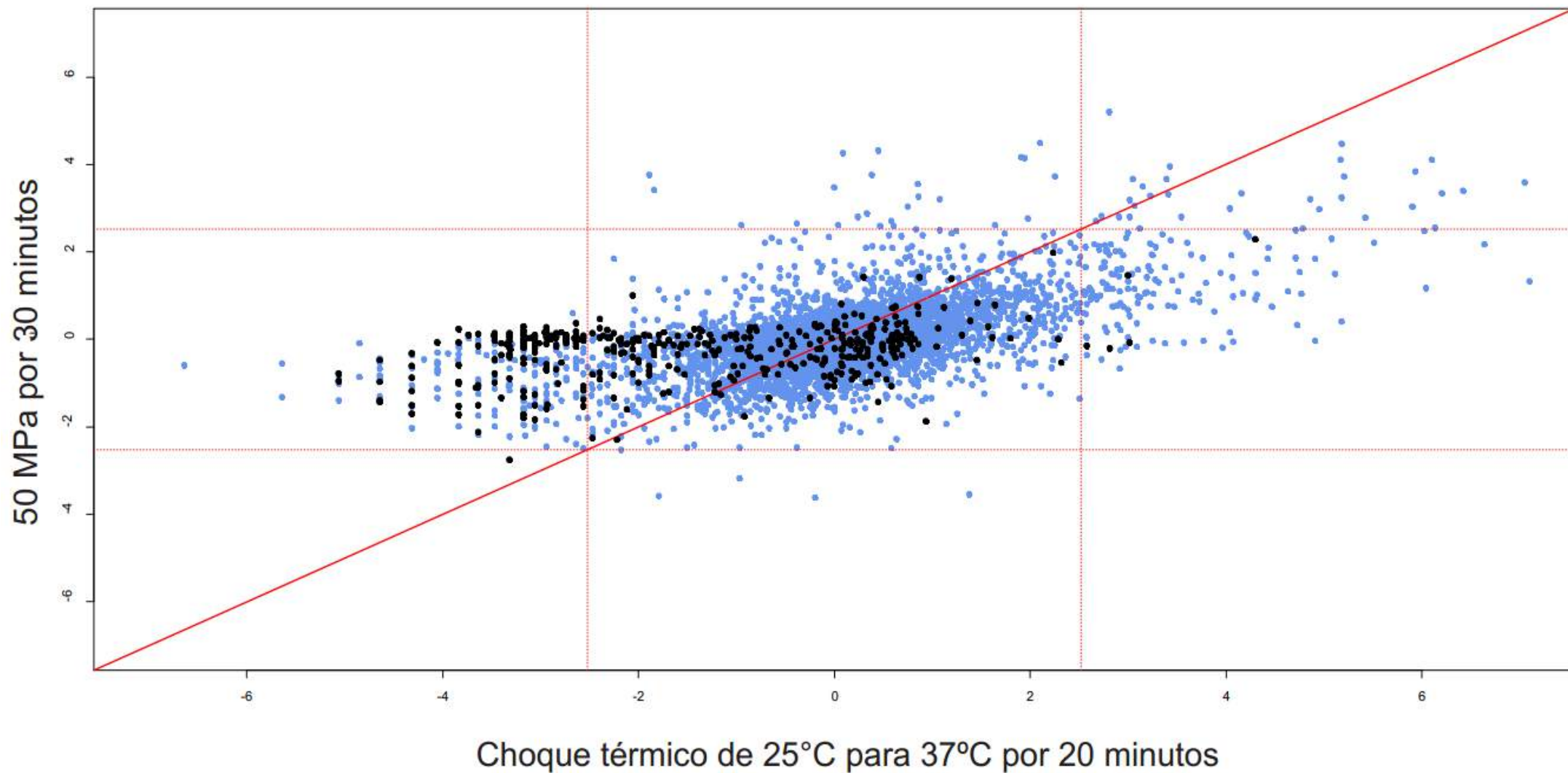


Figura 5 Comparação dos genes ligados a síntese protéica no estresse de 50 MPa por 30 minutos e o choque térmico de 25°C para 37°C por 20 minutos. Os pontos marcados em preto representam os genes da categoria de síntese protéica. Os pontos em azul representam todos os outros genes.

4.2-Avaliação da expressão dos genes ligados a glicólise e gliconeogênese após o tratamento com a alta pressão hidrostática.

A análise dos genes relacionados com as vias glicolítica e gliconeogênica foi realizada utilizando os dados do tratamento de 0 e de 15 minutos após a pressurização. O objetivo foi mostrar como os níveis de transcritos dessas vias se modificam durante esse intervalo.

A via da glicólise em leveduras conta com três isoenzimas responsáveis pela realização da primeira etapa de fosforilação da glicose, Hxk1p, Hxk2 e Glk2p (104). Essas enzimas trabalham em situações fisiológicas diferentes e possuem princípios regulatórios particulares (RODRIGUEZ et al., 2001). Após o tratamento com a alta pressão hidrostática foi observado que duas dessas fosfoquinases estavam ativadas transcricionalmente (Figura 6). Imediatamente após o tratamento de pressão, tanto o gene *HXK1* como *GLK1*, foram altamente regulados, sendo que em 15 minutos após a pressurização, os valores de expressão de ambos se intensificaram (Figura 7). O gene *HXK1* é conhecido por ter seus níveis pós-transcricionais regulados por um motivo 3'UTR. Esse motivo é alvo da ação do complexo PUF (ULBRICHT; OLIVAS, 2008) Nossos resultados demonstram uma correlação negativa entre a queda na expressão de *PUF1* e *PUF4* e o aumento na expressão de *HXK1*. Esse padrão de expressão inverso poderia indicar que o complexo PUF não opera no decaimento do transcrito de *HXK1* durante a resposta a alta pressão hidrostática.

As enzimas Glk1p e Hxk1p possuem seus genes expressos apenas quando a fonte predominante de carbono não é a glicose (RODRIGUEZ et al., 2001). Porém, o gene que codifica a enzima Hxk2p, que é normalmente induzida pela presença de glicose demonstrou um perfil de expressão basal e inalterado durante todos os nossos tratamentos. A enzima Hxk2p existe em leveduras tanto na sua forma citoplasmática, quanto na forma nuclear. Em sua forma nuclear ao mesmo tempo em que reprime a expressão de *HXK1* e *GLK1* ela pode induzir sua própria expressão (HERRERO et al., 1995).

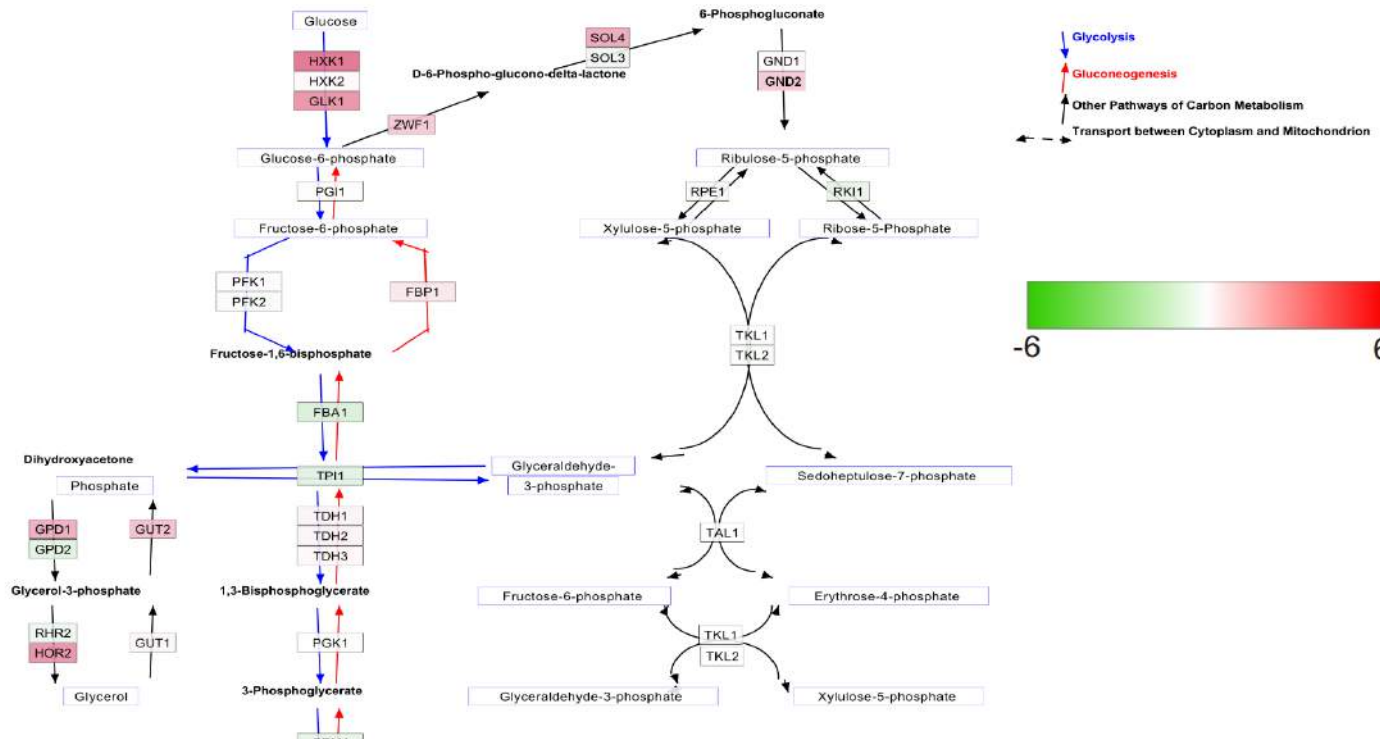


Figura 6 Via glicolítica de *S.cerevisiae* imediatamente após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.

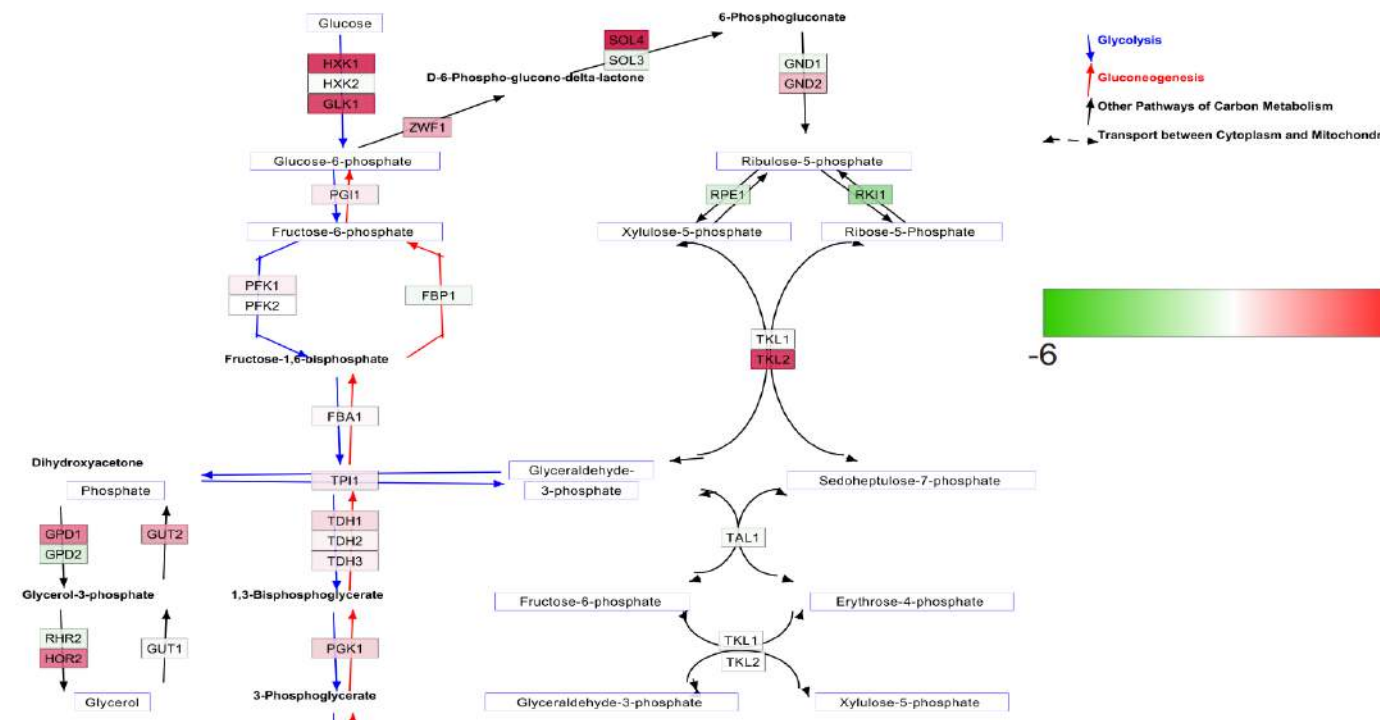


Figura 7 Via glicolítica de *S.cerevisiae* 15 minutos após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão

Além disso, nossos resultados demonstram vários elementos ligados ao fluxo da via glicolítica positivamente regulados 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática. É interessante notar que mesmo com os componentes da via glicolítica tendendo a ativação, o gene *HXK2* que se encontra em um meio com grande disponibilidade de glicose, não possui seu perfil de expressão alterado. Sugerimos que a repressão dos transcritos relacionados aos transportadores de glicose (família HXT) explique o motivo da não modificação do padrão de expressão de *HXK2*. Supomos que com a diminuição dos transportadores de glicose, o aumento na síntese de *HXK2* causaria um grande desperdício energético, uma vez que a quantidade de glicose transportada para o meio celular não seria suficientemente alta a ponto de necessitar de uma produção de novas enzimas (uma vez que o custo das enzimas hexocinases é bem elevado). Por outro lado, seria possível que uma maior ativação de *HXK2* iniciasse um processo de repressão nos genes das isoenzimas *HXK1* e *GLK1*. A função desempenhada por *HXK1* e *GLK1* durante a resposta ao estresse não é bem clara, porém esses genes compartilham diversos fatores de regulação normalmente utilizados nessas respostas (HERRERO et al., 1995).

Em vários estresses já descritos na literatura, nota-se que genes ligados à utilização de fontes alternativas de carbono podem sofrer regulação positiva durante e após uma situação estressante (GASH et al., 2000). Uma parte desse comportamento acontece como um reflexo da quantidade de diferentes produtos metabólicos gerados ao decorrer de uma situação estressante. O glicerol acumulado durante o estresse osmótico (REGINA; EDWIL, 2002) e o acetato produzido durante o desbalanço redox (NAVARRO-AVIÑO et al, 1999), são exemplos dessa situação.

Já foi demonstrado que o estresse causado pela pressurização é capaz de gerar vários desequilíbrios celulares. Entre os efeitos da alta pressão podemos citar os danos causados pelo estresse oxidativo (AERTSEN et al, 2005). Sabemos que múltiplas vias são ativadas durante a resposta contra espécies reativas de oxigênio, sendo uma delas a regeneração do NADPH pela via das pentoses fosfato (GONZÁLEZ-SISO et al., 2009). Em nosso perfil de expressão, encontramos desde o tempo zero, imediatamente após o piezotratamento, a ativação do gene *ZWF1*. Esse gene é conhecido por manter um papel crucial na detoxificação de ROS, tanto

em leveduras quanto em humanos (IZAWA et al., 1998). Além de *ZWF1*, os genes *SOL4* e *GND2* dessa mesma via metabólica, também foram fortemente expressos.

Em *S.cerevisiae*, a trealose é o carboidrato de reserva mais utilizado durante a resposta a vários estresses (PEREIRA et al., 2001). Uma de suas funções já elucidadas é a de suprimir a agregação de proteínas desnaturadas (SINGER; LINDQUIST., 1998). O papel da trealose na proteção contra a agregação proteica é descrito como a via primária de resposta ao desenovelamento de proteínas.

Os genes da trealose-6-fosfato apresentaram indução após os nossos tratamentos com a pressurização (Figura 8). A enzima trealose-6-fosfato sintase é construída por um interessante complexo proteico sintetizado pelos genes *TP1*, *TPS3* e *TSL1* (WINDERICKX et al., 1996), nossos dados mostram que todo esse complexo foi induzido fortemente.

De forma semelhante a outros estresses, o piezotratamento faz com que as células induzam também os genes responsáveis pela segunda parte da reação da formação da trealose, que transforma α,α -trealose-6-fosfato em trealose, sendo que todos os genes responsáveis por essa reação possuem a indução de sua expressão maior que quatro vezes. Em nossos tratamentos também foi encontrado o interessante paradoxo já descrito por vários grupos, em que tanto as vias de síntese de trealose, como as de degradação são ativadas ao mesmo tempo durante a resposta ao estresse (SINGER ;LINDQUIST., 1998). Uma provável explicação para esse evento antagônico pode ser a existência de elementos STRE nos promotores de *NTH1*, *TPS1* e *TPS3* (ZÄHRINGER et al., 2000; MESQUITA et al., 2003), o que é capaz de causar a co-expressão desses genes em um mesmo momento.

O estresse por altas pressões também demonstrou induzir o aumento dos genes relacionados à síntese de glicerol. Os genes *GPD1* e *HOR2* são responsáveis por transformar a dihidroxiacetona em glicerol. Esse genes são normalmente superexpressos sob condições de estresse osmótico severo (HIRAYAMA et al., 1995 ; ALBERTYN et al., 1994), sendo o mutante em *GPD1* inapto a crescer em condições de hiperosmolaridade (NEVOIGT ;STAHLU, 1997). Em um trabalho anterior do grupo, em que células de levedura foram submetidas a uma pressão de 200 MPa por 30 minutos, foi demonstrado por microscopia eletrônica, que as altas pressões hidrostáticas

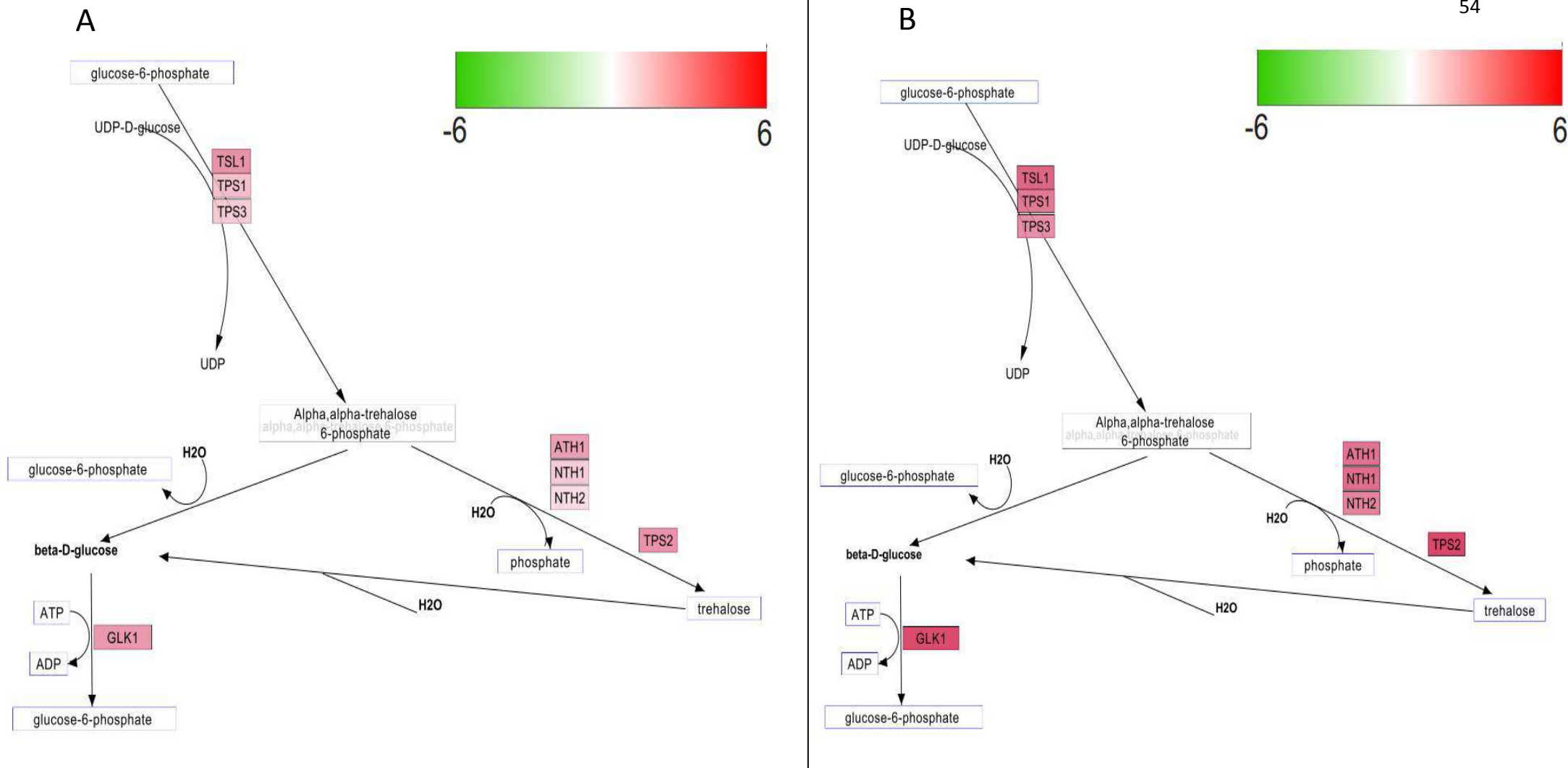


Figura 8 Via bioquímica da biosíntese e catabolismo de trealose. (A) perfil da via imediatamente após o tratamento por 30 minutos com 50MPa.(B) perfil da via 15 minutos após o tratamento por 30 minutos com 50MPa. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão.

são capazes de causar sérios danos a estrutura do vacúolo, bem como a redução dessa organela (FERNANDES et al, 2001). Já foi descrito na literatura que a resposta ao estresse osmótico tem forte relação com o vacúolo e depende da liberação do sinalizador Ca^{+2} , que é armazenado no seu interior, para o meio citoplasmático. Entre os mecanorreceptores envolvidos nessa liberação podemos citar o canal Yvc1p que é sensível a pequenas variações de pressão. Estudo com Yvc1p tem demonstrado que valores maiores que 1,33 MPa induzem a liberação do cálcio retido nos vacúolos, iniciando assim uma resposta ao estresse osmótico (ZHOU et al., 2003) . É possível que a forte ação causada pela alta pressão hidrostática nos vacúolos, seja uma das causas da ativação dos genes *GPD1* e *HOR2*. Porém, é possível que outra grande quantidade de genes relacionados à resposta ao estresse osmótico tenha sua expressão estimulada por esse mesmo mecanismo.

Outra possível explicação para o aumento de transcritos envolvidos com a via de formação do glicerol é baseada na observação de que a presença de glicerol durante o processo de pressurização diminui a taxa de desdobramento de proteínas (VADIM et al, 1993). Neste caso, teríamos juntamente com a trealose e as chaperonas, o glicerol, atuando na resposta celular contra os danos causados às estruturas das proteínas.

Como mostrado na figura 7, pode-se notar uma aparente indução de um ciclo fútil entre *GPD1* e *GUT2*. Porém é importante notar que esses genes, **(1)** codificam enzimas que estão em compartimentos celulares diferentes (*GUT2* mitocondrial e *GPD1* citoplasmático). **(2)** Possuem papéis em estresses diferentes, sendo a superexpressão de *GUT2* necessária para manter o balanço redox das células (GRANDIER-VAZEILLE et al., 2001) , enquanto *GPD1* tem função no combate ao estresse hiperosmótico. É possível que a ativação antagônica desses dois genes ocorra devido ao papel biológico desses dois genes diante dos múltiplos estresses causados pela pressurização.

Em um modelo sugerido por Blomberg.,(2000), os ciclos fúteis com gasto de ATP, bem comuns durante a resposta ao estresse, seriam uma estratégia fisiológica para escoar o ATP que é acumulado durante a parada brusca da biosíntese de macromoléculas. Uma vez que o desbalanço causado por altas concentrações de

ATP leva a morte celular. Desta forma, a inclusão de válvulas metabólicas seria uma saída bastante prática para evitar esse tipo de ocorrência.

O processo de pressurização também induz a transcrição de vários genes da via do ácido tricarboxílico (figura 9). Nesta via temos a indução dos genes *CIT1* e *CIT2* que codificam as enzimas responsáveis pela síntese de citrato a partir de Acetil-Coa e oxalacetato. Cit1p é uma enzima mitocondrial que limita o fluxo da via do ácido tricarboxílico (SUISSA et al 1984) e sua expressão é aumentada durante o momento inicial pós pressurização e se intensifica com o passar do tempo. O gene *CIT2* codifica uma enzima peroxissomal e é superexpresso logo após o piezotratamento, porém tem suas taxa de transcrição reprimida 15 minutos após o tratamento depressão.

Um perfil parecido acontece em *ACO1* e *ACO2* que são os elementos responsáveis por transformar o citrato gerado pelas citrato sintases em isocitrato. O microarranjo demonstra a inibição de *ACO2* 15 minutos após a pressurização. Porém, *ACO1*, que tem um importante papel na manutenção do mRNA mitocondrial (CHEN et al., 2005), aumenta sua expressão nesse mesmo tempo.

Em uma visão geral, o perfil transcricional da via do ácido tricarboxílico induziu, após a pressurização, a expressão de todos os seus principais constituintes. Um fato interessante é a inibição do transcrito ligado à transformação do malato em piruvato, que acontece por meio da descarboxilação oxidativa do malato pela enzima málica *MAE1* (BOLES et al., 1998). Essa repressão de *MAE1*, fortalece a ideia de que durante o piezoestresse, o piruvato formado durante a glicólise, seja desviado para a formação de Acetil-Coa e, conseqüentemente, entre no ciclo de Krebs.

A lógica de transcrição dessas vias parece demonstrar que não existe gliconeogênese durante e após a aplicação do estresse por alta pressão.

Algumas evidências indicam que existe um grande fluxo em direção a glicólise e não a gliconeogênese. Uma delas, é a expressão aumentada de *PFK26*, que regula a atividade de *Pfk1p* e *Pfk2p* pela formação do indutor alosterico frutose-2,6-bifosfato (HEINISCH et al., 1996). Apesar de não se saber como, já foi descrito que a ação de *PFK26* além estimular a glicólise, inibe a gliconeogênese (MULLER et al. 1997).

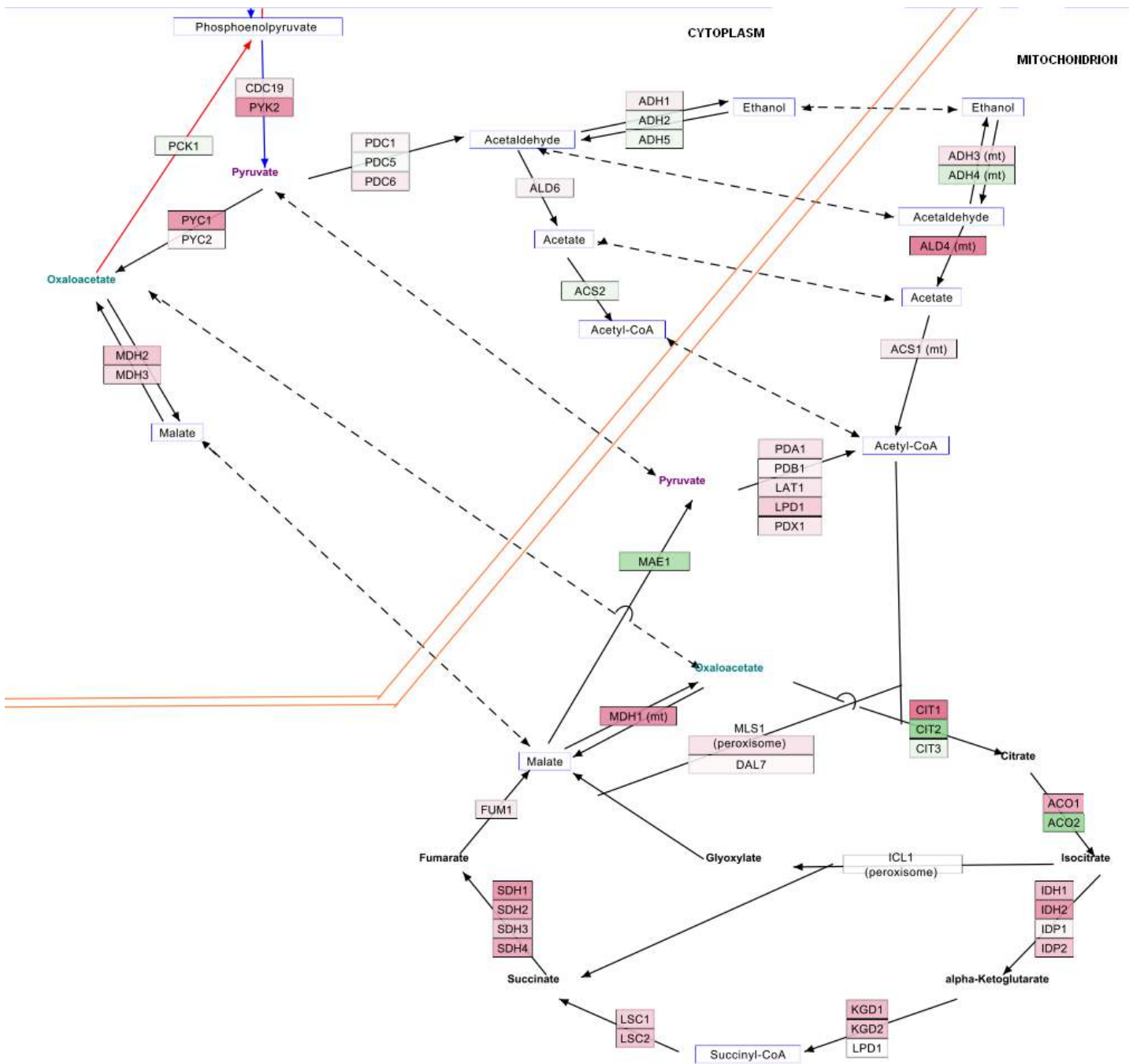


Figura 9 Via bioquímica do ciclo do ácido cítrico 15 minutos após o tratamento por 30 minutos com 50MPa. Os genes que apresentam a cor vermelha possuem sua expressão induzida, genes com a cor verde estão reprimidos e genes com a cor branca não tiveram alteração no seu padrão de expressão

4.3-Análise das redes de funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares.

Uma forma diferente de entender como o perfil transcricional funciona é utilizar a abordagem de redes e grafos. Essa abordagem, unida à atribuição de termos (GO), permite separar os genes, mais e menos expressos, após os nossos tratamentos com um maior grau de liberdade. Dessa forma, podemos agrupar os genes por funções biológicas, processos biológicos ou componentes celulares.

A primeira análise foi executada comparando os genes induzidos positivamente (mais que duas vezes) em 0 e 15 minutos pós-pressurização. No minuto 0, imediatamente após o tratamento com a alta pressão, observamos que os genes mais induzidos pertenciam ao grupo de genes relacionadas à membrana (Figura 10). Já é conhecido, que importantes mudanças na membrana são necessárias para a sobrevivência em ambientes com altos valores de pressão (FANG et al., 2010). Estes resultados demonstram que durante o estresse de pressão, a modificação no perfil de expressão de genes ligados a membrana é uma prioridade quando comparado a genes relacionados a outros componentes celulares. As proteínas de membrana representadas aqui, não se restringem apenas a membrana plasmática, pelo contrário, vários desses genes codificam proteínas de membranas que fazem o transporte de macromoléculas e íons do citoplasma para o interior de diferentes organelas. Observamos que vários canais transportadores de íons presentes nas membranas de várias organelas são expressos durante e após o tratamento com a alta pressão (ex: *ENA1* e *ENA5*).

Sabendo que o estresse por alta pressão pode causar danos às organelas que armazenam íons, como o vacúolo e retículo endoplasmático (FERNANDES et al, 2001), é esperado que os íons de forma voluntária (como um mecanismo de resposta) ou involuntária (como no extravasamento dos íons para o citoplasma) sejam liberados para o citoplasma durante o processo de pressurização. Supomos que a indução dos genes que codificam transportadores surja como resultado de uma estratégia para o bombeamento desses íons para o exterior da célula ou para o interior do vacúolo ou retículo endoplasmático.

Dois termos que se referem a funções biológicas foram exclusivos da resposta imediatamente após o tratamento de pressão (tempo 0). O termo metabolismo de

compostos heterocíclicos e metabolismo de aminoácidos. Metabolismo de composto heterocíclicos é uma termo utilizado para representar genes que tem um papel na produção de compostos que possuem anéis em sua estrutura, com ao menos dois átomos diferentes. Adicionalmente, a metionina, já explorada nesse trabalho, os aminoácidos prolina e glutamato parecem também ser importantes durante a resposta ao piezotratamento

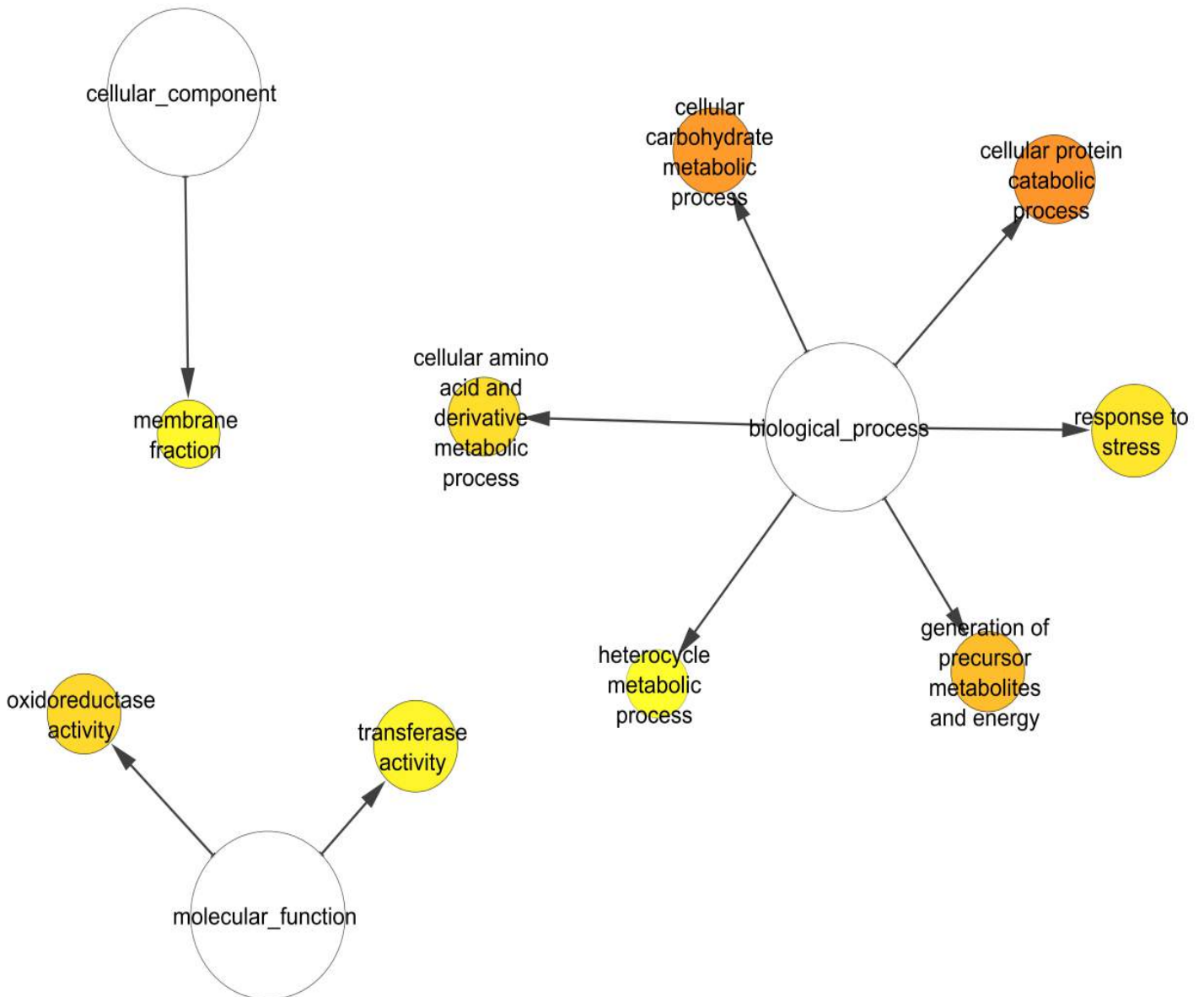


Figura 10 Principais termos relacionados aos genes induzidos imediatamente após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. A intensidade das cores demonstra a significância estatística dos termos e o tamanho do nodo mostra a quantidade de genes relacionados com o termo.

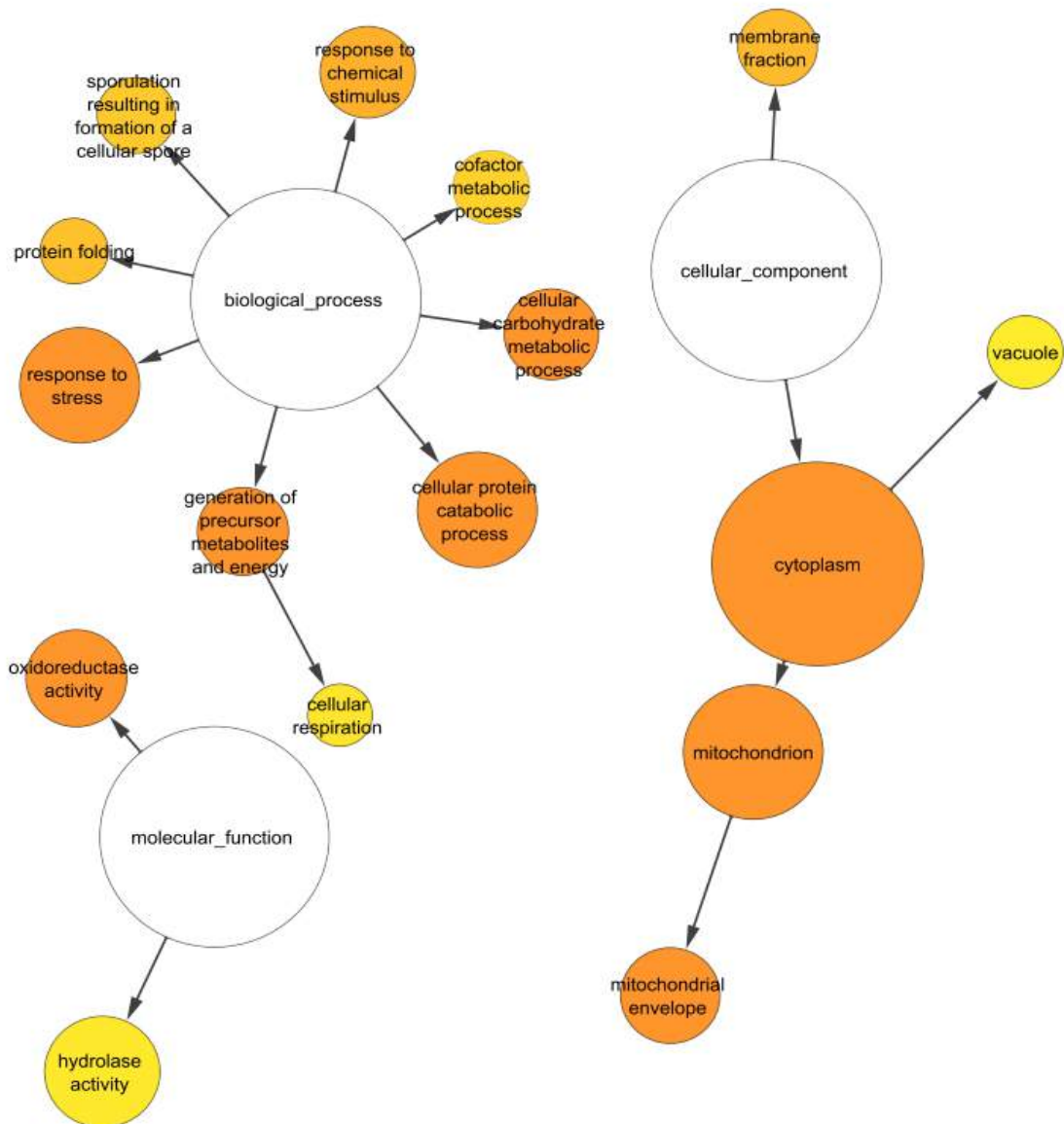


Figura 11 Principais termos relacionados aos genes induzidos 15 minutos após o tratamento de 50 MPa por 30 minutos. A intensidade das cores demonstra a significância estatística dos termos e o tamanho do nodo mostra a quantidade de genes relacionados com o termo.

1998). Em leveduras, o acúmulo desses aminoácidos está relacionado à tolerância aos estresses por congelamento, etanol, dissecação e H_2O_2 (MATSUURA; TAKAGI, , 2005; MORITA et al., 2002, 2003; TAKAGI et al., 1997, 2000, 2005; TERAO et al., 2003) O papel funcional específico desses dois aminoácidos pode variar desde a captura de espécies reativas de oxigênio (SMIRNOFF ;CUMBES , 1989),

estabilização de membranas durante o congelamento (RUDOLPH; CROWE ,1985) ou inibição na agregação de proteínas desenoveladas durante processo de redobramento (SAMUEL et al., 2000).

O perfil transcricional em resposta a pressurização, mostrou que genes relacionados a três classes específicas de reações catalíticas foram abundantes. Imediatamente após o piezotratamento (tempo 0), os genes mais induzidos foram relacionavam-se a atividades enzimáticas de oxidoredução e de transferência de grupos químicos (representados pelas transferases). Em 15 minutos após a pressurização os transcritos mais encontrados estavam relacionados as atividades hidrolase e oxidoredução.

Tanto no momento imediatamente após a pressurização, quanto 15 minutos depois, os transcritos referentes à atividade de *oxidoredução* foram abundantemente encontrados. Na literatura já foi demonstrado que a alta pressão hidrostática é capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (AERTSEN et al, 2005). e que a atividade de diversas oxidoreduções são importantes para a redução dessas moléculas oxidantes (GRANT, 2001; LI W et al , 2006; JAMIESON, 1998; LIU; THIELE , 1996). Esses resultados corroboram com dados anteriores do grupo, que demonstraram que a suplementação com antioxidantes, antes do tratamento com alta pressão hidrostática, eleva a taxa de sobrevivência das células (PALHANO et al., 2004).

O grupo formado pelos genes que catalisam reações de transferências de grupos químicos, só foram presentes imediatamente após o tratamento com a alta pressão hidrostática. Nessa classe de reações, encontramos genes superexpressos que desempenham o papel na síntese de ceramidas, glicogênio, aminoácidos e ácido gama aminobutírico (GABA).

O termo hidrolase presente 15 minutos após a pressurização, foi construído pela reunião de vários genes ligados à proteólise e ao redobramento de proteínas. Percebemos que, em geral, a atividade catabólica é fortemente induzida, apenas 15 após a pressurização. A partir da análise desses dados, sugerimos que, imediatamente após aplicação do tratamento de pressão, as alternativas tomadas para minimizar os danos causados as proteínas, são possivelmente realizadas por meio de pequenas moléculas como trealose, prolina e glutamato. Especulamos que

mecanismos mais específicos de combate ao desenvolvimento sejam ativados apenas em uma resposta mais tardia.

4.4-Busca por fatores de transcrição ligados a mudança transcricional temporal

A ferramenta DREM (Dynamic Regulatory Event Miner) foi utilizada para investigar a atuação dos fatores de transcrição na expressão genica temporal da *S. cerevisiae* submetida ao estresse de HHP. Este software combina algoritmos de regressão logística, atribuição de termos (GO) e um banco de dados de interação DNA-proteínas para identificar grupos gênicos que sofreram controle transcricional induzido por oscilações no nível de expressão de determinados fatores de transcrição.

A dinâmica transcricional das células em resposta a alta pressão hidrostática exibe um complexo padrão. A Figura 12 apresenta um mapa temporal obtido através do DREM o qual resultou em cinco caminhos controlados por um total de 12 fatores de transcrição.

Podemos dividir esses caminhos como caminhos bifurcados e caminhos diretos (Figura 12). As bifurcações são criadas quando em um dado momento um grupo de genes, que possuía valores de expressão semelhante e era controlado pelos mesmos fatores de transcrição, se diverge em um novo braço. Enquanto os caminhos diretos são braços que não sofreram nenhuma bifurcação em todos os tempos.

O único caminho direto mostrado na figura foi o que pertencia ao grupo de genes reprimidos. Esse caminho direto apresentou grande quantidade de fatores de transcrição induzindo efeitos repressores em seus genes. A atribuição de termos mais significativa ($5,2 \times 10^{-8}$) enquadrou esses genes como pertencentes a categoria de transporte transmembrana de íons.

Todos os braços gerados por genes que foram regulados positivamente possuíram bifurcações com a passagem do tempo. Os dados sugerem que no imediatamente após o tratamento de pressão (tempo 0), o fator de transcrição Rgm1p possa regular os genes ligados a glicólise, cadeia transportadora de elétrons, biogênese de

peroxissomos, biogênese de mitocôndria e biossíntese de membranas, porém não foi possível encontrar quais são os fatores de transcrição responsáveis pela bifurcação nesse braço, que aconteceu 10 minutos após a pressurização.

Outro fator de transcrição encontrado foi Cin5p e está relacionado com o controle de genes positivamente regulados. A bifurcação controlada por esse fator de transcrição engloba vários genes de resposta a estresse, sendo que a maioria desses genes tem o papel de evitar danos causados por espécies reativas de oxigênio. Cabe salientar, que uma grande parcela de genes pertencentes à mitocôndria demonstrou também ser afetados pelos níveis transcricionais de Cin5p.

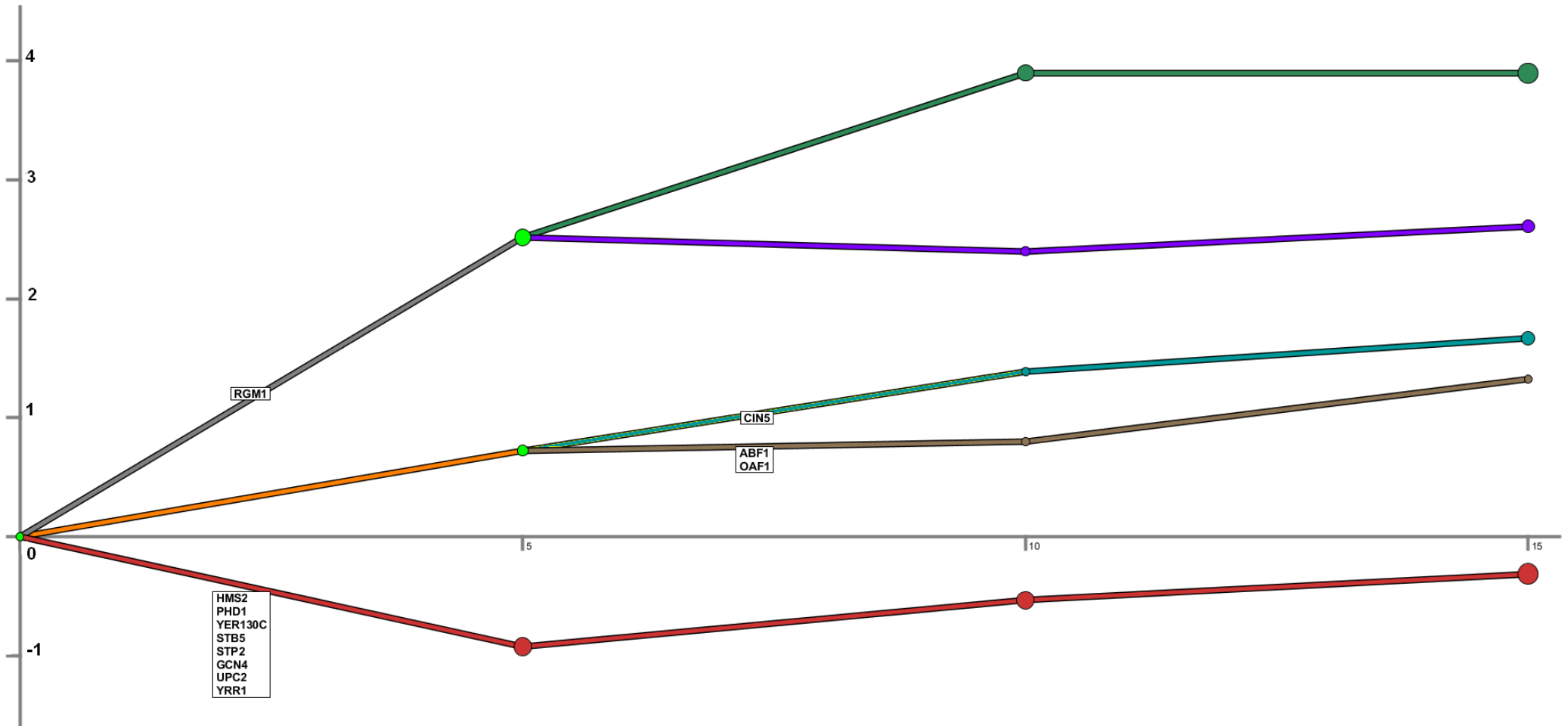


Figura 12 Identificação dos pontos de bifurcação 5, 10 e 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática (50 MPa por 30 minutos). Os braços formados demonstram grupos gênicos que se diferenciaram à medida que o tempo aumentava. As bifurcações são indicadas pela atribuição de novas cores aos braços. Em alguns braços foram identificados fatores de transcrição que estão relacionados ao comportamento dos grupos gênicos. O tamanho de cada círculo está relacionado a distribuição normal da expressão dos genes que aquele grupo possui.

Tabela 2 Processos biológicos atribuídos a cada ramo por meio da busca de termos (GO)

Ramo dos genes reprimidos			Ramo dos genes induzidos		
Fatores de transcrição controladores de bifurcação	Processo biológico	p-value	Fatores de transcrição controladores de bifurcação	Processo biológico	p-value
	(GO)			(GO)	
HMS2, PHD1, YER130C, STB5, STP2, GCN4, UPC2, YRR1	Transporte transmembrana de cátions monovalentes	5.2×10^{-8}	RGM1	Envelope de organelas	2.4×10^{-4}
	Transporte transmembrana de íons	1.1×10^{-6}		Componentes de membrana	4.3×10^{-4}
	Biossíntese de ATP	3.1×10^{-5}	CIN5	Mitocôndrias	8.7×10^{-10}
	Biossíntese de compostos nitrogenados	6.4×10^{-5}	ABF1, OAF1	Processos de oxi-redução	2.2×10^{-9}
				Metabolismo de glucano	2.5×10^{-6}
				Proteassoma	3.3×10^{-24}

Do mesmo ponto que surgiu o braço controlado por Cin5p, originou-se outro braço controlado pelos fatores de transcrição Abf1p e Oaf1p. Nesse braço encontramos grupos gênicos responsáveis pelo transporte intracelular durante a resposta ao estresse, ativação de genes envolvidos na beta-oxidação de ácidos graxos, organização e biogênese dos peroxissomos e do complexo proteassômico. Estudos anteriores demonstraram que o complexo proteassômico é essencial para uma transcrição eficiente de genes relacionados na resposta ao estresse, por regular os níveis e, conseqüentemente, a atividade de muitos fatores de transcrição gene-específicos (SULAHIAN et al., 2006; DEVANJAN et al., 2006).

4.5-Identificação de elementos regulatórios nos genes que possuem expressão imediatamente após a pressurização e repressão nos tempos posteriores.

No intuito de entender quais genes se relacionam com os minutos iniciais da resposta a alta pressão hidrostática, selecionamos alguns genes para a busca por elementos de regulação de DNA e RNA que poderiam ser relacionados à barotolerância. O critério utilizado para essa análise foi a escolha de genes que possuíam valores maiores que 2 no momento imediatamente após a pressão (tempo 0), e que nos momentos seguintes, apresentavam um decaimento na quantidade de seu transcrito (valores de expressão menores que zero). Assim, foram formados três grupos de genes. Os grupos ficaram com a seguinte divisão, genes que eram expressos imediatamente após o tratamento (tempo 0) e reprimidos em 5 minutos, genes que eram imediatamente após o tratamento (tempo 0) e reprimidos em 10 minutos e genes que eram expressos imediatamente após o tratamento (tempo 0) e reprimidos em 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática.

Em cada grupo, foi realizada uma busca por termos gerais que definiam a função biológica de seus genes. Junto com a procura por termos, a ferramenta FIRE buscou por elementos de DNA e RNA que eram compartilhados em cada grupo.

Os termos associados aos genes que decaíam 5, 10 ou 15 minutos após o piezotratamento indicaram que o metabolismo de moléculas sulfurosas, transporte de amina e progressão do ciclo celular foram os termos com maior significância para a definição desses grupamentos. O motivo que possuiu a maior associação dentre os diferentes grupos, foi o motivo alvo do fator de transcrição Cbf1p. Sendo o grupo de genes que mais apresentou este motivo em seus genes, foram aqueles que apresentaram decaimento 5 minutos após o tratamento com alta pressão.. A segunda maior associação foi vista no grupo que possuía o decaimento da sua transcrição em 10 minutos pós-pressurização, sendo o motivo 3'UTR CGGAGC, encontrado no mRNA dos genes participantes desse grupo.

A sequência motivo que se liga ao fator de transcrição CBF1 também foi encontrada no grupo que tem sua transcrição reprimida em 15 minutos, porém com uma associação estatística menor do que a encontrada nos genes que decaem 5 minutos após o piezotratamento.

Tabela 3 Busca por motivos reguladores no DNA e RNA de genes com a transcrição diminuída a partir de 5 minutos após o piezotratamento

Tempo (min)	Nome do gene	Função biológica	p-value	Motivo predominante
5	MHT1, DAN1, MET14, AGP1, AYT1, MET3, MET2, MET6, MET17, SEO1	Metabolismo de compostos sulfurados	5.8 x 10 ⁻⁶	CBF1
			2.1 x 10 ⁻³	(3'UTR) CGGAGC
			1.1 x 10 ⁻³	(3'UTR) ACAUUCG
10	CIT2, YLL058w, MET16, NRG1 YOR378w, YNL120c, FAR1,	Metabolismo de compostos sulfurados	2.9 x 10 ⁻⁴	(3'UTR) CGGAGC
15	PRM5, HO, SPR28, MEP1, RTS3, REG2, MET10, MUP3,	Transporte de amina, Ciclo celular	1.2 x 10 ⁻³	CBF1
	PRM1, YOR062c, PUT1, DIP5, YET2		2.8 x 10 ⁻³	(3'UTR)ACAUUCG

O fator de transcrição CBF1 é um elemento cis de regulação, helice-volta-helice relacionado à prototrofia de metionina e a remodelagem da cromatina. CBF1 se liga a um sitio com a sequencia consenso CACGTG (CAI; DAVIS, 1990). Os Genes controlados por CBF1 sofrem regulação negativa pelo aumento do composto S-adenosilmetionina [AdoMet] que é sintetizado pelas isoenzimas Sam1 e Sam2 (THOMAS et al., 1989). A função de AdoMet é relacionada a metilação de proteínas, RNA, biotina, poliaminas e lipídios (CHEREST; SURDIN-KERJAN, 1978; THOMAS; SURDIN-KERJAN, 1997; PHALIP et al., 1999; CHATTOPADHYAY et al., 2006)

Sugerimos que durante o tratamento com alta pressão hidrostática, os níveis de AdoMet se elevem rapidamente na tentativa de reparar as membranas afetadas pelo piezotratamento. O reflexo da forte indução de AdoMet poderia ser o motivo do rápido decaimento dos genes regulados por CBF1, uma vez que AdoMet regula a transcrição de CBF1. Como consequência disso, teríamos também a inibição da transcrição de *SAM1* e *SAM2* pelo próprio AdoMet sintetizado por esses dois genes.

Não existem dados disponíveis na literatura que mostrem quais são as proteínas ligantes dos outros motivos encontrados nessa busca, contudo, observamos que esses motivos observados são compartilhados na estrutura do mRNA do transcrito desses genes, o que pode nos indicar que o decaimento na expressão desses genes seja dependente de fatores pós-transcricionais que atuam após o processo de pressurização.

4.6-Rede de motivos de DNA e mRNA compartilhados entre os genes diferencialmente expressos após o piezotratamento.

A análise da rede regulatória traçada a partir de motivos de DNA e mRNA, compartilhados entre genes diferencialmente expressos após o tratamento com alta pressão hidrostática, mostrou claramente que existem dois principais módulos presentes na rede. Chamamos de módulos as diferentes comunidades de nodos formadas em uma mesma rede. Encontramos na estrutura de um módulo típico, uma baixa frequência de nodos de determinada comunidade se conectando a nodos da vizinhança (HARTWELL et al., 1999; ALON, 2003; PALLA, 2005).

Na rede obtida (Figura 13) encontramos um módulo possuindo motivos que controlam principalmente os genes responsáveis pelo metabolismo energético e a resposta ao estresse. Esse módulo será chamado de módulo (A). No outro módulo, chamado de módulo (B), encontramos motivos que se conectam a genes relacionados à síntese de DNA, RNA e proteínas. Uma diferença marcante entre os dois é que enquanto a tendência do módulo (A) é possuir genes induzidos durante a resposta ao piezotratamento, o módulo (B) possui grupos gênicos em estado de repressão transcricional.

O único grupo gênico que compartilha motivos entre os dois módulos são os genes ligados a formação de complexos proteossomais. Os elementos reguladores encontrados através da ferramenta FIRE no grupo de genes relacionados aos proteossomos, foram MSN2/4, PAC, PUF4(3'UTR) e 5' TGCCACC. Após o tratamento com a alta pressão hidrostática, temos uma interessante correlação negativa entre a diminuição de PUF4 e o aumento de vários genes ligados a subunidades proteossomais. Indicando que a diminuição de PUF4 poderia ser responsável pela manutenção das altas taxas de transcritos de genes pertencentes às proteínas proteossomais. Essa idéia é corroborada por trabalhos que demonstra que PUF4 é responsável por controlar negativamente os níveis pós-transcricionais dos mRNAs a ele ligado (Olivas; Parker, 2000).

Nesse mesmo conjunto de genes dos proteossomos, encontramos o motivo MSN2/4 presente nos promotores de grande parte desse grupo. É possível que MSN2/4 estimule positivamente a transcrição de genes das vias de degradação protéica mediada por proteossomos, sendo que essa atividade surgiria como uma resposta a grande quantidade de proteínas desdobradas durante a ação da alta pressão (BORIS; GOROVITS - 1998).

No modulo A foi encontrado os motivos *TATA* e (3' UTR) *UAUUUUAU* controlando vários genes ligados ao metabolismo de triptofano, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, enzimas ligadas a atividade oxidoreductase e genes pertencentes a cadeia transportadora de elétrons.

Diversas evidências indicam que genes possuindo promotores *TATA* em suas regiões reguladoras, são normalmente associados a elementos de resposta ao estresse e por isso possuem taxas de expressão variáveis em diversas situações perturbadoras. Por outro lado, genes com baixa frequência de sequencias *TATA*, tendem a ser constitutivamente expressos (BASEHOAR et al., 2004; TIROSHI et al., 2006; LANDRY et al., 2007).

O elemento (3' UTR) *UAUUUUAU* já foi encontrado em mamíferos atuando como um fator de desestabilização de mRNA (ZUBIAGA et al., 1995). Nossos dados indicam que esse motivo 3'UTR *UAUUUUAU* possa desempenhar um papel regulador no decaimento dos transcritos induzidos por meio de promotores *TATA* durante a pressurização.

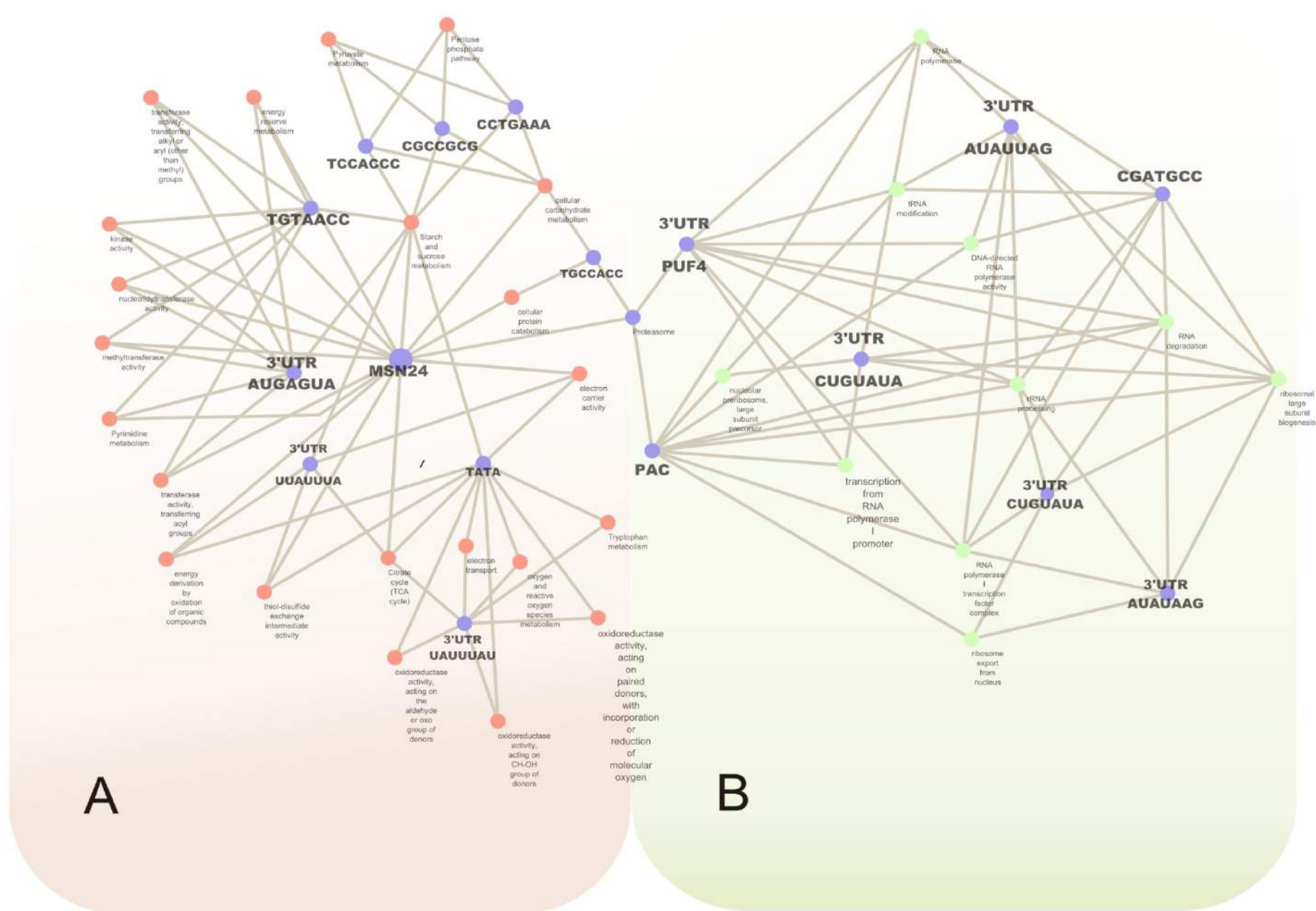


Figura 13 Rede regulatória de motivos de DNA e mRNA. Os círculos em azul representam motivos de DNA e mRNA compartilhados entre os genes diferencialmente expressos após o tratamento com a alta pressão hidrostática. Os grupos de genes que compartilham as mesmas funções biológicas ou processos moleculares são representados com a cor vermelha. As letras A e B representam os dois diferentes módulos encontrados na rede.

O grupo de genes relacionados ao metabolismo de triptofano, que possuem TATA e 3'UTR UAUUUUAU como elementos reguladores, demonstram ter um papel importante durante a resposta ao piezotratamento. Estudos prévios mostraram que o crescimento das células em alta pressão hidrostática é inibido devido à diminuição da disponibilidade de triptofano intracelular, que é causado pela desestabilização do transportador de triptofano de alta afinidade Tat2p, pela ação do piezotratamento ABE; HORIKOSHI, 2000) Sugerimos que alterações no metabolismo de triptofano a partir de elementos TATA e 3'UTR UAUUUUAU durante esse estresse, possam compensar o efeito da supressão mecânica do transporte desse aminoácido.

4.6-Validação dos experimentos de microarranjo por RT-PCR em tempo real

As validações dos experimentos de microarranjo foram feitas através do método de RT-PCR em tempo real. Para isso, os valores de expressão de 10 genes diferentes foram obtidos através da RT-PCR em tempo real e comparados com os valores desses mesmos genes nos experimentos de microarranjo. O teste de Pearson mostrou uma forte correlação ($> 0,7$) entre as mediadas de expressão obtidas no microarranjo e na RT-PCR em tempo real.

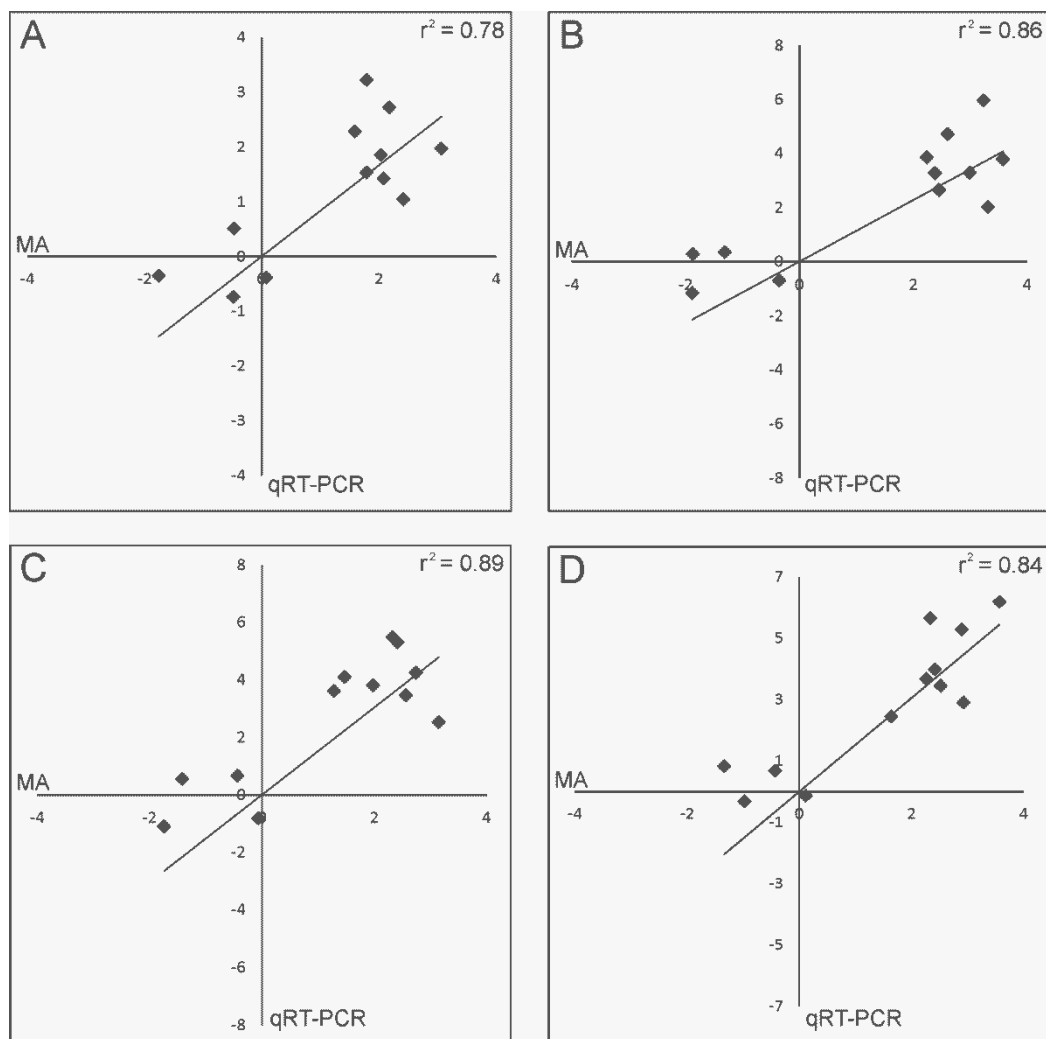


Figura 14 Gráfico de correlação entre as médias do nível de expressão relativa (RQ) obtidos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) e microarranjo (MA). Os dados são plotados em Log_2 e os coeficientes da correlação de Pearson são dados para os genes testados nos diferentes tratamentos com alta pressão hidrostática, 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

Os estudos de microarranjo da linhagem selvagem, BT0605, mostraram que os genes referentes ao metabolismo celular foram altamente afetados pelo tratamento com a alta pressão hidrostática de 50MPa por 30 minutos. A observação temporal desse grupo gênico, mostrou que até 15 minutos após o tratamento com a alta pressão hidrostática, genes da glicólise, respiração celular, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, apresentaram um padrão crescente de expressão.

Nossos dados demonstraram que alguns dos principais genes da via glicolítica foram fortemente induzidos pelo tratamento com a alta pressão hidrostática. Sugere-se que esse efeito de indução, aliado com a fraca repressão dos genes de parada do ciclo celular, possam implementar a produção de etanol em células tratadas com a pressão hidrostática e submetidas ao processo fermentativo.

A comparação dos genes ligados à síntese protéica, metabolismo e proteção celular em células pressurizadas e em células submetidas ao choque térmico, possibilitou a descoberta de genes diferencialmente expressos apenas pelo tratamento com a alta pressão hidrostática. Uma das conclusões possíveis, foi que imediatamente após o tratamento de pressão, o perfil de expressão gênico de ambos é bem diferente. Porém, 15 minutos após o piezotratamento, o choque térmico e a alta pressão hidrostática possuem maior semelhança.

Nossos resultados evidenciaram a importância dos genes relacionados à síntese de metionina na adaptação das células a ambientes com alta pressão hidrostática. Sugere-se que o fator de transcrição CBF1 seja requisitado imediatamente após a aplicação da pressão, e que desempenhe um importante papel para a transcrição desses genes.

Observou-se ainda que as células submetidas a esse valor de pressão induziram genes responsáveis por metabolizar uma diversidade de compostos que minimizam os efeitos deletérios da alta pressão hidrostática nas proteínas, tais como, prolina, trealose, glicerol e metionina.

A análise dos componentes celulares ativados durante o piezotratamento foi unânime em demonstrar que durante a pressurização, os genes mais ativados, possuem relação direta e indireta com as membranas. Isso reforça trabalhos

anteriores que destacam as membranas como componentes mais atingidos pela ação da pressão. Sugerimos que membranas e receptores dos vacúolos que são atingidos pela pressão, desempenhem um papel crítico na resposta osmótica das células submetidas à alta pressão hidrostática.

A indução de genes ligados a produção de GABA (Ácido gama-amino butírico) e a redução do NADP^+ , sugere que a biosíntese de compostos antioxidantes seja crucial para a tolerância ao piezotratamento. Estima-se também, que a expressão de alguns genes mitocondriais, contribua para detoxificação de espécies reativas de oxigênio geradas durante a pressurização, e que esse evento seja importante para a retomada ao estado de equilíbrio após a retirada da fonte estressante.

A busca por motivos compartilhados entre esses grupos demonstrou que os genes induzidos ou reprimidos durante esse estresse, possuem diferentes motivos que promovem tanto a indução de sua expressão bem como o decaimento. Vários desses motivos, descritos neste trabalho, necessitam de informações a cerca de quais proteínas interagem com suas seqüências reguladoras, sendo esse um importante passo para o entendimento do papel desses motivos na regulação da resposta a alta pressão hidrostática.

Fatores de transcrição importantes, como MSN2/4, apesar de participarem da ativação de uma ampla categoria de processos como, a sinalização celular, a obtenção de energia e a degradação de proteínas, não mostraram possuir mudanças transcricionais significativas, sugerindo que, se existir o aumento transcricional desses genes, ela ocorra no exato momento da aplicação do estresse e que esse aumento seja seguido de um rápido decaimento de seus transcritos. Porém, já foi mostrado que vários fatores de transcrição não necessitam de aumento nos seus níveis transcricionais para efetuarem seu papel, mas sim de sua mobilização do citoplasma para o núcleo (TROTT; MORANO, 2003).

Observou-se que os motivos PAC e PUF4 desempenham um papel importante na repressão do crescimento celular das células submetidas a alta pressão hidrostática. Outros fatores transcricionais avaliados, como Cin5p e Rgm1p, demonstraram coordenar temporalmente a ativação de conjuntos de genes ligados a resposta ao estresse oxidativo e genes relacionados às membranas.

Estes resultados contribuem para um melhor entendimento da dinâmica e perfil da resposta transcricional, dos genes do metabolismo de células submetidas à alta pressão hidrostática. Além de abrir o caminho para investigações de genes importantes para aquisição de mecanismos de tolerância aos diferentes estresses encontrados durante varias aplicações biotecnológicas.

6-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABE, F.; HORIKOSHI, K. Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 21, p. 8093-102, nov 2000.

AERTSEN, A. et al. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 5, p. 2226-31, mar 2005.

AERTSEN, A.; MEERSMAN, F.; HENDRICKX, M. E. G.; VOGEL, R. F.; MICHIELS, C. W. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 7, p. 434-441, 2009.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 545-55, ago 2010.

ALBERTYN, J. et al. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 4135-44, jun 1994.

ALON, U. Biological networks: the tinkerer as an engineer. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1866-7, set 2003.

ANANTHARAMAN, V.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 7, p. 1427-1464, abr 2002.

ARAVA, Y.; WANG, Y.; STOREY, J. D.; LIU, C. L.; BROWN, P. O.; HERSCHLAG, D. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 3889-3894, mar 2003.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nat Biotechnol**, v. 15, n. 13, p. 1351-7, dez 1997.

BAKER, M. Next-generation sequencing: adjusting to data overload. **Nature Methods**, v. 7, p. 495 – 499, 2010.

BALL, C. A. et al. Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 77-80, jan 2000.

BALNY, C.; MASSON, P.; HEREMANS, K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. **BBA - Protein Struct Mol**, v. 1595, n. 1-2, p. 3-10, mar 2002.

BANG, W. S.; CHUNG, H. J. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **N Biotechnol**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2010.

BARABÁSI, A. L; OLTVAI, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 2, p. 101-113, feb 2004.

BASEHOAR, A. D.; ZANTON, S. J.; PUGH, B. F. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 699-709, mar 2004.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24261-7, jun 2001.

BISSON, L. F.; FRAENKEL, D. G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 6, p. 1730-4, mar 1983.

BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 182, n. 1, p. 1-8, jan 2000.

BOLES, E.; DE JONG-GUBBELS, P.; PRONK, J. T. Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. **J Bacteriol**, v. 180, n. 11, p. 2875-82, jun 1998.

BOY-MARCOTTE, E.; PERROT, M.; BUSSEREAU, F.; BOUCHERIE, H.; JACQUET, M. 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**, v. 180, n. 5, p. 1044-1052, mar 1998.

BRUL, S.; ROMMENS, A. J. M.; VERRIPS, C. T. Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure. **Innovative Food Sci Emerg**, v. 1, n. 2, p. 99-108, 2000.

CAI, M. and DAVIS, R.W. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. **Cell**, v. 61 n.3, p. 437-46, 1990.

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.

CHATTOPADHYAY, M.K., TABOR, C.W., TABOR, H.. Methylthioadenosine and polyamine biosynthesis in a *Saccharomyces cerevisiae* meu1delta mutant. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, n.1, p. 203-7, 2006.

CHEN, X. J. et al. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. **Science**, v. 307, n. 5710, p. 714-7, fev 2005.

CHEREST, H. AND SURDIN-KERJAN, Y.. S-adenosyl methionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. **Mol Gen Genet.**, v. 163, n. 2, p. 153-67,1978.

COHEN, R.; HAVLIN, S. Scale-free networks are ultra small. **Phys Rev Lett**, v. 90, p. 058701, 2003.

DE MAIO, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock**, v. 11, n. 1, p. 1-12, jan 1999.

DE MESQUITA, J. F.; PANEK, A. D.; DE ARAUJO, P. S. In silico and in vivo analysis reveal a novel gene in *Saccharomyces cerevisiae* trehalose metabolism. **BMC Genomics**, v. 4, n. 1, p. 45, nov 2003.

DE VIRGILIO, C.; HOTTIGER, T.; DOMINGUEZ, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. **Eur J Biochem**, v. 219, n. 1-2, p. 179-186, jan 1994.

DELUNA, A. et al. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. **J Biol Chem**, v. 276, n. 47, p. 43775-83, nov 2001.

DEVANJAN SIKDER,STEPHEN ALBERT JOHNSTON AND THOMAS KODADEK. Widespread, but Non-identical, Association of Proteasomal 19 and 20 S Proteins with Yeast Chromatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 27346-27355, 2006.

ERNST, J.; VAINAS, O.; HARBISON, C. T.; SIMON, I.; BAR-JOSEPH, Z. Reconstructing dynamic regulatory maps. **Mol Syst Biol**, v. 3, p. 74, jan 2007.

Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 469-486, out 2000.

FANG, J.; ZHANG, L.; BAZYLINSKI, D. A. Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 9, p. 413-22, set 2010.

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.; JAIN, P.; MOITA, C. Training Experimental Biologists in Bioinformatics. **Advances in Bioinformatics**, v. 2012, n. 2012, 1-4, 2012.

FERNANDES, P.M.B., DOMITROVIC, T., KAO, C.M., KURTENBACH, E.. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Lett.**, v. 556, n. 1-3, p. 153-60, 2004.

FISHER, J.; HENZINGER, T. A. Executable cell biology. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1239-1249, nov 2007.

FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Yeast: growth during fermentation. In: FLEET, G. H. (Eds.). Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, p. 27-54, 1993.

FRANCOIS, J.; BLÁZQUEZ, M. A.; ARINO, J.; GANCEDO, C. Stages carbohydrates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: ZIMMERMAN, F. K.; ENTIAN, K. D. (Eds.). *Yeast Sugar Metabolism*. Technomic Publication, Lancaster, PA, 285-311, 1997.

FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 1, p. 125-145, jan 2001.

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.

GASCH, A. P. The Environmental Stress Response: a common yeast response to environmental stresses. In: *Yeast Stress Responses*. S. Hohmann and P. Mager (eds). V. 1, *Topics in Current Genetics* (series editor S. Hohmann): Springer-Verlag Heidelberg, p. 11-17, 2002.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. et al. Sugar metabolism, redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 46, ago 2009.

GOROVITS, B. M.; HOROWITZ, P. M. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. **Biochemistry**, v. 37, n. 17, p. 6132-5, abr 1998.

GRANDIER-VAZEILLE, X., BATHANY, K., CHAIGNEPAIN, S., CAMOUGRAND, N., MANON, S., SCHMITTER, J.M.. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. **Biochemistry**, v. 40, n. 33, p. 9758-69, 2001.

GRANT, C. M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 533-41, fev 2001.

HARTWELL, L. H. et al. From molecular to modular cell biology. **Nature**, v. 402, n. 6761 Supp, p. C47-52, dez 1999.

HEINISCH, J. J.; BOLES, E.; TIMPEL, C. A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-bisphosphate. Glycolysis/metabolic regulation/allosteric control. **J Biol Chem**, v. 271, n. 27, p. 15928-33, jul 1996.

HEREMANS, K. Protein dynamics: hydration and cavities. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 8, p. 1157-1165, 2005.

HERRERO, P. et al. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. **Yeast**, v. 11, n. 2, p. 137-44, fev 1995.

HETTEMA, E. H.; TABAK, H. F. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. **Biochim Biophys Acta**, v. 1486, n. 1, 18-27, jun 2000.

HIRAYAMA, T. et al. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet**, v. 249, n. 2, p. 127-38, nov 1995.

IWAHASHI, H. et al. Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. **FEMS Microbiol Lett**, v. 108, n. 1, p. 53-7, mar 1993.

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.

IZAWA, S. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v. 330, n. Pt 2, p. 811-7, mar 1998.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1511-27, dez 1998.

JELINSKY, S. A.; ESTEP, P.; CHURCH, G. M.; SAMSON, L. D. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 21, p. 8157-8167, nov 2000.

JEONG, H.; MASON, S. P.; BARABÁSI, A.-L.; OLTVAI, Z. N. Lethality and centrality in protein networks. **Nature**, v. 411, v. 6833, p. 41-42, mai 2001.

JORGENSEN, P. et al. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. **Genes Dev**, v. 18, n. 20, p. 2491-505, out 2004.

KELLIS, M. et al. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 241-54, maio 2003.

Kitano, H. Computational systems biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206-210, nov 2002.

KUHN, K. M.; DERISI, J. L.; BROWN, P. O.; SARNOW, P. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 916-927, feb 2001.

LANDRY, C. R. et al. Genetic properties influencing the evolvability of gene expression. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 118-21, jul 2007.

LI, W. et al. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 4, p. 1802-11, abr 2006.

LIMA, L. T. R.; FOGUEL, D.; SILVA, J. L. DNA tightens the dimeric DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein without changes in volume. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 26, p. 14289-14294, dez 2000.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 1151-91, 1986.

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.

LIU, X.; ZHANG, M.; DUAN, J.; WU, K. Gene expression analysis of germinating rice seeds responding to high hydrostatic pressure. **J Plant Physiol**, v. 165, n. 18, p. 1855-1864, 2008.

LOS, D. A.; MURATA, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochim Biophys Acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 142-157, nov 2004.

LUCERO, P. et al. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4456-61, out 2000.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? An introduction and overview. Yearbook of Medical Informatics: Yale University, USA, p. 83-100, 2001.

MAHMUD, S. A. et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, n. 1, p. 17-30, jan 2009.

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T.; MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; MARCHLER-BAUER, A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. 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. 2227-2235, mai 1996.

MASSELOT, M.; DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H. Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. **Mol Gen Genet**, v. 139, n. 2, p. 121-32, ago 1975.

MATSUURA, K.; TAKAGI, H. Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng**, v. 100, n. 5, p. 538-44, nov 2005.

MENTRÉ, P., HAMRAOUI, L., HUI BON HOA, G., DEBEY, P.. 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, 1999.

MILANESI, L.; D'ANGELO, D.; ROGOZIN, I. B. GeneBuilder: interactive in silico prediction of gene structure. **Bioinformatics**, v. 15, n. 7-8, p. 612-621, jul-ago 1999.

MITCHELL, A. et al. Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 220-4, jul 2009.

MOLINA-GARCIA, A.D., SANZ, P.D.. Anisakis simplex larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. **J. Food Prot.**, v. 65, p. 383–388, 2002.

MORITA, Y.; NAKAMORI, S.; TAKAGI, H. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng**, v. 94, n. 5, p. 390-4, 2002.

MORITA, Y.; NAKAMORI, S.; TAKAGI, H. L-proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the PRO1 gene encoding gamma-glutamyl kinase. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 1, p. 212-9, jan 2003.

MOZHAEV, V. V. et al. Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. **Biotechnol Bioeng.**, v. 52, n. 2, p. 320-31, out 1996.

MÜLLER, S.; ZIMMERMANN, F. K.; BOLES, E. Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. **Microbiology**, v. 143, n. Pt 9, p. 3055-61, set 1997.

NAVARRO-AVIÑO, J. P. et al. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. **Yeast**, v. 15, n. 10A, p. 829-42, jul 1999.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 21, n. 3, p. 231-41, nov 1997.

NOBLE, D. The music of life: Biology beyond the genome. Oxford University Press, 2006.

NOVO, M. T. et al. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. **Int J Food Microbiol**, v. 86, n. 1-2, p. 153-61, set 2003.

OLIVAS, W.; PARKER, R. The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. **EMBO J**, v. 19, n. 23, p. 6602-11, dez 2000.

OLTVAI, Z. N.; BARABÁSI, A. L. Systems biology: Life's complexity pyramid. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 763-764, out 2002

PÅHLMAN, I. L. et al. Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 31, p. 27991-5, ago 2002.

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 2004.

PALLA, G. et al. Uncovering the overlapping community structure of complex networks in nature and society. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 814-8, jun 2005.

PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 89, n. 1, p. 24-31, jul 2000.

PELHAM, H. R. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. **Cell**, v. 30, n. 2, p. 517-28, set 1982.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C.; PANEK, A. D. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiol**, v. 1, p. 11, jul 2001.

PHALIP, V., KUHN, I., LEMOINE, Y., JELTSCH, J.M.. Characterization of the biotin biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and evidence for a cluster containing BIO5, a novel gene involved in vitamer uptake. **Gene**, v. 232, n.1, p. 43-51, 1999.

POOLMAN, B.; GLAASKER, E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. **Mol Microbiol**, v. 29, n. 2, p. 397-407, jul 1998.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, jun 2000.

RABOY, B. et al. Heat-induced cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the RAD6/UBC2 and WSC2 genes in its reversal. **Mol Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 729-39, maio 1999.

RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; PRIETO, J. A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends Biotechnol**, v. 17, n. 6, p. 237-44, jun 1999.

RANGEL, D. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 1281-96, jun 2011.

REYES, M. C., TAUC, P., BROCHON, J.C.. Pressure effects on the physical properties of lipid bilayers detected by trans-parinaric acid fluorescence decay. **Biophys J.**, v. 65, n.5, p. 2248–2260, 1993.

RITA SULAHIAN, STEPHEN ALBERT JOHNSTON AND THOMAS KODADEK. The proteasomal ATPase complex is required for stress-induced transcription in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 5, p. 1351–1357, 2006. doi:10.1093/nar/gkl012.

RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 659-72, nov-dez 2010.

RODRÍGUEZ, A. et al. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v. 355, n. Pt 3, p. 625-31, maio 2001.

RUDOLPH, A. S.; CROWE, J. H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. **Cryobiology**, v. 22, n. 4, p. 367-77, ago 1985.

RUEPP, A., ZOLLNER, A., MAIER, D., ALBERMANN, K., HANI, J., MOKREJS, M., TETKO, I., GÜLDENER, U., MANNHAUPT, G., MÜNSTERKÖTTER, M., MEWES, H.W.. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 18, p. 5539-45, 2004.

SAMUEL, D. et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding. **Protein Sci**, v. 9, n. 2, p. 344-52, fev 2000.

SANTANGELO, G. M.; TORNOW, J. Efficient transcription of the glycolytic gene ADH1 and three translational component genes requires the GCR1 product, which

can act through TUF/GRF/RAP binding sites. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 859-862, feb 1990.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **J Biol Chem**, v. 265, n. 21, p. 12111-4, jul 1990.

SCHMITT, A. P; MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 12, p. 5777-5782, jun 1996.

SHALEM, O.; DAHAN, O.; LEVO, M.; MARTINEZ, M. R.; FURMAN, I.; SEGAL, E.; PILPEL, Y. Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. **Mol Syst Biol**, v. 4, n. 223, p. 1-10, out 2008.

SHEARER, A. E.; KNIEL, K. E. High hydrostatic pressure for development of vaccines. **J Food Prot**, v. 72, n. 7, p. 1500-1508, jul 2009.

SHEPARD, K. A.; GERBER, A. P.; JAMBHEKAR, A. et al. Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11429-11434, set 2003.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D. Hydration, cavities and volume in protein folding, aggregation and amyloid assembly. **Phys Biol**, v. 6, n. 1, p. 15002009, fev 2009.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Mol Cell**, v. 1, n. 5, p. 639-48, abr 1998.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 11, p. 460-8, nov 1998.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1057-106, 1989.

SUISSA, M.; SUDA, K.; SCHATZ, G. Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. **EMBO J**, v. 3, n. 8, p. 1773-81, ago 1984.

TAKAGI, H. et al. Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. **J Biosci Bioeng**, v. 103, n. 4, p. 377-80, abr 2007.

TAKAGI, H. et al. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 8656-62, dez 2005.

TAKAGI, H. et al. Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 184, n. 1, p. 103-8, mar 2000.

TAKAGI, H.; IWAMOTO, F.; NAKAMORI, S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 47, n. 4, p. 405-11, abr 1997.

TARASSOV, K.; MESSIER, V.; LANDRY, C. R.; RADINOVIC, S.; SERNA MOLINA, M. M.; SHAMES, I.; MALITSKAYA, Y.; VOGEL, J.; BUSSEY, H.; MICHNICK, S. W. An in vivo map of the yeast protein interactome. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1465-1470, mai 2008.

TAUSCHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 200, n. 1, p. 3-13, 1995.

TERAO, Y.; NAKAMORI, S.; TAKAGI, H. Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 11, p. 6527-32, nov 2003.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: BRAMBL, R.; MARZLUF, G. A. (Eds.). *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, pp. 395-420.

THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem Sci**, 20, n. 1, p. 3-10, jan 1995.

THOMAS, D. AND SURDIN-KERJAN, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol.**, v. 61, n.4, p.503-32, 1997.

THOMAS, D., CHEREST, H., AND SURDIN-KERJAN, Y.. Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. **Mol. Cell. Biol**, v.9, p.3292-3298, 1989.

THOMAS, D.; BECKER, A.; SURDIN-KERJAN, Y. Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 52, p. 40718-24, dez 2000.

THOMSON, J. M. et al. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Nat Genet**, v. 37, n. 6, p. 630-5, jun 2005.

TININIS, C. R. C. S.; GATTAS, E. A. L. Efeito da temperatura de estocagem de leveduras de panificação sobre a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, n. 1 , p. 81-87, mar 2002.

TIROSH, I. et al. A genetic signature of interspecies variations in gene expression. **Nat Genet**, v. 38, n. 7, p. 830-4, jul 2006.

TRAVERS, K. J. et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 249-58, abr 2000.

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

ULBRICHT, R. J.; OLIVAS, W. M. Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. **RNA**, v. 14, n. 2, p. 246-62, fev 2008.

UNNIKRISHNAN, I. et al. Multiple positive and negative elements involved in the regulation of expression of GSY1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 29, p. 26450-7, jul 2003.

ÜRGÜN, S.; BUZRUL, S. Use of genetic algorithms for high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms. **Afr J Biotechnol**, v. 10, n. 65, p. 14543-51, out 2011.

VAN DIJKEN, J. P.; WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 3-4, p. 343-352, 1993.

WANG, E.; LENFERINK, A.; O'CONNOR-MCCOURT, M. Cancer systems biology: exploring cancer-associated genes on cellular networks. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 14, p. 1752-1762, jul 2007.

WANG, Y.; LIU, C. L.; STOREY, J. D., et al. Precision and functional specificity in mRNA decay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n.9, p. 5860-5865, abr 2002.

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

WINDERICKX, J. et al. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? **Mol Gen Genet**, v. 252, n. 4, p. 470-82, set 1996.

WINTER R, JEWORREK C. Effect of pressure on membranes. **Soft Matter**, v. 5, p. 3157-3172, mai 2009.

WONG, C. M. et al. Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 5385-94, fev 2002.

YALDAGARD M.; MORTAZAVI, S.A.; TABATABAIE, F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation. **African J Biotechnol**, Vol. 7, n. 16, p. 2739-2767, ago 2008

ZÄHRINGER, H.; THEVELEIN, J. M.; NWAKA, S. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. **Mol Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 397-406, jan 2000.

ZHOU, X. L. et al. Zhou, X L; Batiza, A F; Loukin, S H; Palmer, C P; Kung, C; Saimi, Y. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 12, p. 7105-10, jun 2003.

ZUBIAGA, A. M.; BELASCO, J. G.; GREENBERG, M. E. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 4, p. 2219-30, abr 1995.