

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Brígida de Almeida Amorim Spagnol

**EFEITO DA LONGEVIDADE NA RESPOSTA A ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE *Saccharomyces cerevisiae***

VITÓRIA

2016

Brígida de Almeida Amorim Spagnol

**EFEITO DA LONGEVIDADE NA RESPOSTA A ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE *Saccharomyces cerevisiae***

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

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

VITÓRIA

2016

Brígida de Almeida Amorim Spagnol

**EFEITO DA LONGEVIDADE NA RESPOSTA A ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Comissão Examinadora

Profª.Drª. Patrícia B. Machado Fernandes
(Orientadora – UFES)

Prof. Dr. Antônio Alberto R. Fernandes
(Co-orientador – UFES)

Prof. Drª. Gláucia R. Abreu
(UFES – CCS)

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
(UFES – BIOTEC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é aquele que permite todo o progresso da ciência e a razão da minha existência.

À prof. Dr^a Patrícia M. Bueno Fernandes, por me dar a oportunidade de fazer parte do grupo desse laboratório. Por acreditar e incentivar a minha proposta de pesquisa e por todo conhecimento que me transmitiu nesses dois anos.

Ao prof. Dr. Antônio Alberto R. Fernandes, pelos conhecimentos transmitidos e por todo empenho em manter e garantir o funcionamento do laboratório.

À Dr^a Fernanda Bravim, por todo apoio na elaboração desse trabalho, dedicação, paciência e por sempre ter se colocado à disposição para esclarecer as dúvidas. A todos os colegas do laboratório, pela troca de conhecimento, apoio e amizades construídas.

Aos professores Breno V. Nogueira, Gláucia R. Abreu e por aceitarem o convite para fazerem parte da comissão avaliadora. À professora Jenifer Saffi, que também aceitou o convite para compor a banca, mas que por motivos de força maior não pode estar presente, mas mesmo assim contribuiu com sugestões. E também, a todos os professores do programa de Biotecnologia por fazerem parte de mais uma importante etapa de nossas vidas.

A minha mãe Marina e minha irmã Talita que sempre foram as minhas melhores amigas e incentivadoras. Ao meu padrasto Paulo, por todo carinho e por sempre estar disposto a ajudar quando precisamos. E ao meu querido pai Râmiton *in memoriam*, que com certeza estaria muito orgulhoso se pudesse presenciar mais essa conquista.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo amor, paciência e companheirismo nos momentos mais difíceis e por estar sempre incentivando a nunca desistir.

As agências de fomento CAPES, FAPES e CNPQ por viabilizar os recursos para a execução desse projeto. E à UFES, que é onde me graduei em Enfermagem, onde estou me pós-graduando como mestre, além de ser onde trabalho.

*“Ele é o Deus que me reveste de força e torna perfeito o meu caminho”
(Salmos 18: 32).*

RESUMO

Muitos estudos mostram que existe uma forte relação entre a ativação de vias reguladoras de resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento. Embora as causas do envelhecimento sejam multifatoriais, essas vias reguladoras se mostram surpreendentemente conservadas entre os eucariontes. Manter os mecanismos de resposta ao estresse eficientes pode ser uma estratégia potencial para prolongar a longevidade, retardar o envelhecimento e o surgimento das doenças associadas a idade. A ciência da longevidade e do envelhecimento conduz ao uso de organismos modelos como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, pois estas células revelam também preservação das vias envolvidas com o balanço energético, acúmulo de danos, resposta ao estresse, integridade genômica, apoptose, entre outros. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da alta pressão hidrostática (HHP) em células-mães e células-filhas de *S. cerevisiae*, a fim de elucidar se a longevidade favorece a resposta ao estresse. Para isso, separaram-se células-mães de células-filhas através do método de cromatografia de afinidade, onde as células-mães tiveram sua superfície celular marcada com biotina e estreptavidina contendo microesferas magnéticas. Após isso, permitiu-se que essas células-mães gerassem células-filhas que nascessem sem marcação. Assim, o inóculo foi adicionado a uma coluna magnética, na qual, as células marcadas ficavam retidas e as não marcadas eluíam para um tubo de ensaio. Para indução do estresse, utilizou-se a HHP que é uma ferramenta capaz de induzir estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, e isso possibilitou analisar a sobrevivência das leveduras e a expressão de genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento. Observou-se que células-mães e filhas apresentam consideráveis diferenças desde as taxas de sobrevivência quanto aos resultados de expressão gênica. De forma que o primeiro grupo de células apresentou melhores resultados na resposta adaptativa ao estresse do que o segundo grupo. Dessa forma, podemos concluir que o estresse mostrou contribuir com a longevidade e a longevidade também mostrou ser importante para os mecanismos de respostas adaptativas mais eficazes contra os estímulos estressores.

Palavras-chave: Alta Pressão Hidrostática (HHP), *Saccharomyces cerevisiae*, estresse, longevidade, envelhecimento.

ABSTRACT

A strong relationship between the activation of regulatory pathways in response to stress, longevity and aging has been pointed out in many studies. The causes of aging are multifactorial, affecting a series of cell mechanisms, but these regulatory pathways among eukaryotes are surprisingly well-conserved. The maintenance of an efficient stress response mechanism can be a potential strategy to extend longevity and to delay aging and the appearance of age-associated diseases. In research addressing longevity and aging, model organisms such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are being used, since the pathways involved in energy balance, damage accumulation, stress response, genomic integrity, apoptosis, and other mechanisms are also preserved in these cells. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effects of high hydrostatic pressure (HHP) on mother and daughter cells of *S. cerevisiae*, to investigate whether longevity favors stress response. To achieve these goals mother cells and daughter cell were separated through of affinity chromatography method, where mother cells had their cell surface marked with biotin and streptavidin containing magnetic microbeads. After that, it was allowed that the mother cells could generate unlabeled daughter cells. Thus, the inoculum was added to a magnetic column where the labeled cells were retained and the unlabeled eluted into a test-tube. To cause stress was used the HHP that is a useful tool to induce oxidative stress in *S. cerevisiae*, making it possible to analyze yeast survival and gene expression involved in stress response, longevity and aging. We observed huge differences of the mother and daughter cells, between survival rates as well as between the results of gene expression. So that the first group of cells produced better results in the adaptative response to stress than the second group. It was therefore concluded that stress contributes to longevity, and longevity in turn proved important for the most effective adaptive response mechanisms to stress stimuli.

Keywords: High Hydrostatic Pressure (HHP), *Saccharomyces cerevisiae*, stress, longevity, aging.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema dos danos acumulados durante o envelhecimento em leveduras..... | 15 |
| Figura 2: Esquema da formação das espécies reativas de oxigênio..... | 18 |
| Figura 3: Esquema da resposta adaptativa ao estresse..... | 23 |
| Figura 4: Esquema da biotinylação de superfície celular..... | 30 |
| Figura 5: Sobrevivência das cepas S288C e UCC5181 ao tratamento por HHP..... | 37 |
| Figura 6: Sobrevivência da população geral, células-filhas e células-mães da cepa UCC5181..... | 38 |
| Figura 7: Expressão dos principais genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento em cepas UCC5181 de <i>S. cerevisiae</i> em pressão ambiente..... | 42 |
| Figura 8: Expressão dos principais genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento em cepas UCC5181 de <i>S. cerevisiae</i> após HHP..... | 42 |
| Figura 9: Esquema da possível sinalização do estresse oxidativo envolvendo atividade mitocondrial..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados como primers na reação de qRT-PCR..... | 34 |
| Tabela 2: Descrição dos genes utilizados na análise de RT-PCR..... | 40 |

LISTA DE SIGLAS

ATP = Adenosina trifosfato

AE = Tampão acetato de sódio e EDTA

cAMP = Adenosina monofosfato cíclico

cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementar

CLS = Tempo de vida cronológico

DNA = Ácido desoxirribonucléico

dNTP = Deoxinucleotídeo trifosfato

D.O = Densidade óptica

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

GTP = Guanosina monofosfato

HHP = Alta pressão hidrostática

MPa = MegaPascal

NAD = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PBS = Tampão fosfato-salino

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PKA = Proteína quinase A

RecQ = Enzimas helicases

RLS = Tempo de vida replicativo

RNA = Ácido ribonucléico

ROS = Espécies reativas de oxigênio

r.p.m = Rotações por minuto

RT = Transcriptase reversa

RQ = quantificação relativa

SDS = dodecil sulfato sódico

UFC = Unidades formadoras de colônias

YEPD = Extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1. 1.LONVEVIDADE E ENVELHECIMENTO..... | 10 |
| 1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO ORGANISMO MODELO EUCARIONTE..... | 11 |
| 1.2.1. Longevidade e envelhecimento em <i>S. cerevisiae</i>..... | 14 |
| 1.3. INSTABILIDADE GENÔMICA NO ENVELHECIMENTO..... | 16 |
| 1.4. O ESTRESSE..... | 17 |
| 1.4.1. A Alta Pressão Hidrostática como modelo de estresse..... | 20 |
| 1.4.2. Efeitos da HHP em <i>S. cerevisiae</i>..... | 21 |
| 1.4.3. Resposta de <i>S. cerevisiae</i> ao estresse por HHP..... | 22 |
| 1.5. GENES ENVOLVIDOS COM LONGEVIDADE..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS..... | 27 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 27 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 3.1. MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO..... | 28 |
| 3.2. TRATAMENTO POR HHP..... | 29 |
| 3.3. PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-MÃES E TRATAMENTO POR HHP..... | 31 |
| 3.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL..... | 32 |
| 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 35 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 36 |
| 4.1. SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS S288C E UCC5181..... | 36 |
| 4.2. SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-MÃES E CÉLULAS-FILHAS..... | 37 |
| 4.3. EXPRESSÃO GÊNICA..... | 40 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 52 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 54 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. LONGEVIDADE E ENVELHECIMENTO

A longevidade pode ser determinada como um aumento da expectativa de vida de um ser vivo, e muitos fatores que estendem o tempo de vida são comuns a vários organismos vivos, como por exemplo, leveduras, moscas, vermes, peixes, roedores e macacos. A compreensão dos mecanismos responsáveis por esse processo traz a possibilidade de prevenir as perdas das funções relacionadas ao envelhecimento e doenças relacionadas a idade (FONTANA *et al.*, 2010).

O envelhecimento é um processo complexo associado ao acúmulo de danos, redução das funções celulares, aumento da susceptibilidade a doenças que conduzem todos os seres vivos à morte. Mas, pode também ser definido como uma consequência do acúmulo de danos decorrentes das atividades metabólicas no decorrer da vida (FONTANA *et al.*, 2010; LIPPUNER *et al.*, 2014). Um fator marcante do envelhecimento é a parada irreversível da proliferação, chamada de senescência (CAMERONI *et al.*, 2010)

A expectativa de vida humana tem aumentado nos últimos anos, pois muitos avanços na medicina como o combate à mortalidade infantil, a prevenção e o tratamento de doenças infecto-contagiosas, as vacinações, por exemplo têm permitido isso. Porém, esse aumento na longevidade tem vindo acompanhado de um grande aumento na incidência de doenças relacionadas a idade (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2014).

A idade é o maior fator de risco de mortalidade para quase todas as doenças do envelhecimento. Recentes descobertas científicas têm objetivado explicar os mecanismos biológicos do envelhecimento através de ensaios moleculares e talvez mais importantes, potenciais intervenções para retardar o envelhecimento e promover a longevidade saudável. A investigação sobre processos básicos do envelhecimento pode trazer maior qualidade de vida do que as abordagens das doenças relacionadas a ela (KAEBERLEIN *et al.*, 2015).

Estima-se que aproximadamente $\frac{1}{4}$ das diferenças na expectativa de vida em humanos sejam explicadas por fatores genéticos. O aumento da sobrevivência é apenas um dos aspectos do envelhecimento. Para os humanos, o mais interessante da longevidade extrema é manter um bom desempenho funcional. Geralmente, a idade biológica de uma pessoa costuma ser mais associada com características e capacidades físicas do que com a própria idade cronológica, de forma que as pessoas mais ativas e saudáveis são geralmente consideradas biologicamente mais jovens (MELZER *et al.*, 2007).

O processo do envelhecimento humano pode ser alterado através da manipulação de vias biologicamente conservadas entre eucariontes. Por outro lado, o declínio das funções dos sistemas celulares com a idade depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Estes fatores podem ser revertidos, por exemplo, através de manipulação genética ou da utilização de ferramentas biotecnológicas capazes de induzir alterações de expressões gênicas. Isso indica que estratégias de rejuvenescimento poderão, no futuro, reduzir ou reverter o tempo do envelhecimento (OCAMPO & BELMONTE, 2015).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO EUCARIONTE

Saccharomyces cerevisiae são fungos eucariotos, unicelulares, heterotróficos, com parede celular definida. Seu tamanho pode variar entre 2-3 μm , largura de 1-10 μm e comprimento de 20-50 μm . A média de volume celular pode variar de 29 μm^3 para células haploides 55 μm^3 em diploides, de forma que o volume celular aumenta com a idade ou número de divisões. Suas colônias podem apresentar morfologias variadas, podendo ser ovais, cilíndricas, esféricas, apiculadas ou elipsoides. Dentre as variadas espécies suas colônias podem mostrar pigmentos brancos, creme, rosa, vermelho, laranja, amarelo e até preto. Esses organismos apresentam também formas diferentes de divisão sexual, podendo se dividir por esporulação ou brotamento (BRAVIM, 2011; HARTWEEL & UNGER, 1977).

Esse microorganismo engloba 26 gêneros, pertencente à família *Saccharomycetaceae* da classe dos *Saccharomycetes*. Apresentam algumas características peculiares como uma alta capacidade fermentativa e divisão por gemulação ou brotamento. A forma de divisão assimétrica dessas células faz com que a célula-mãe retenha praticamente o dobro do volume de suas filhas. Nesse processo de divisão a nova célula surge como um broto ou gêmula na célula-mãe, e cresce até se separar dela. Após a separação, a célula-filha deixa uma cicatriz na célula-mãe. O número de cicatrizes na parede celular permite determinar a idade replicativa da célula (BRAVIM, *et al.*, 2010; KREGGER-VAN, 1987). Cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* costumam replicar-se em uma média de 26 vezes (KAEBERLEIN *et al.*, 2005a).

As leveduras são as principais responsáveis pela transformação da glicose em etanol e dióxido de carbono. Isso justifica a sua utilização há milênios na produção de pães e bebidas alcoólicas, e provavelmente, o fato de ser um dos microorganismos mais estudados cientificamente. Atualmente, observa-se também um grande aumento da utilização desse microorganismo como ferramenta biotecnológica e organismo modelo (BRAVIM, 2010).

Em 1959, foi proposta pela primeira vez a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para o estudo do envelhecimento em humanos. Na época, a sugestão foi recebida com ceticismo considerável, pois, apesar desse organismo ter sido muito importante para a compreensão de processos celulares básicos em humanos, muitos não acreditavam que um organismo unicelular tão simples pudesse fornecer informações cabíveis ao envelhecimento humano, um dos fenômenos biológicos mais complexos (BITTERMAN *et al.*, 2003).

Embora as causas do envelhecimento sejam multifatoriais, vias de longevidade reguladoras do envelhecimento se mostram surpreendentemente conservadas entre os eucariontes. Compreender os mecanismos moleculares que regulam o envelhecimento e a longevidade é de extrema relevância para compensar o impacto de desordens associadas com a idade e aumentar o tempo de vida de forma saudável, pois muitas vias que modulam a longevidade se mantem

conservadas, desde as leveduras até os primatas (BITTERMAN *et al.*, 2003; NIKOLETOPOULOU, 2014).

O processo de envelhecimento em microorganismos modelo como *S. cerevisiae* parece ser afetado por várias vias bioquímicas, incluindo danos oxidativos e lipídicos. A manutenção e reparo de danos ao DNA, o controle da apoptose e da senescência, muitas vezes em resposta a esses danos, parece afetar o envelhecimento através de mecanismos de proteção cruzada. Entender o papel dos causadores intermediários do envelhecimento e como variações genéticas podem levar ao aumento saudável da expectativa de vida pode conduzir a novas intervenções para impedir um envelhecimento prematuro (MELZER *et al.*, 2007).

A ciência da longevidade e do envelhecimento conduz ao uso de organismos modelos, pois estes modelos revelam também preservação das vias envolvidas com o balanço energético, acúmulo de danos e resposta ao estresse. Além disso, a conservação da integridade genômica tem se mostrado como um importante fator na manutenção da longevidade e viabilidade celular. Com tantas semelhanças, o uso de organismos modelo se torna uma importante ferramenta para compreender a base molecular do envelhecimento em humanos (HASTY *et al.*, 2003).

Porém, outros fatores influenciam positivamente a utilização da *S. cerevisiae* como organismo modelo e importante ferramenta biotecnológica: seu genoma está totalmente sequenciado desde 1996, possui um tempo de vida reprodutivo em torno de 90 minutos, o que permite análises e resultados mais rápidos, apresenta baixa patogenicidade e é de fácil manipulação genética. Essas características tornam possível alterar processos celulares e monitorar alterações moleculares importantes para diversos estudos, dentre estes, a longevidade e o envelhecimento em eucariontes (BREITENBACH *et al.*, 2014; SILVA, 2009).

1.2.1. Longevidade e envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae*

Grandes avanços têm sido alcançados nas últimas décadas relativos à compreensão do processo de envelhecimento e isso tem elevado o otimismo de que as intervenções para retardar esse processo possam estar ao nosso alcance. Fatores envolvidos com longevidade em leveduras têm sido mostrados para modular o envelhecimento em modelos de mamíferos e invertebrados. Isso demonstra que as primeiras intervenções para retardar o envelhecimento humano podem brotar de um humilde fermento (KAEBERLEIN, 2010).

A manipulação genética tem favorecido a aplicação de tratamentos para prolongar a vida útil de diversos organismos apesar da senescência celular se tratar de um processo, até então, incontrolável e influenciado por fatores genéticos e fatores intrínsecos e extrínsecos. É cada vez mais evidente que os mecanismos de resposta ao estresse estejam intimamente envolvidos com o processo de longevidade e envelhecimento. Dessa forma sugere-se que a longevidade está relacionada à capacidade de um organismo lidar eficazmente tanto com os estresses intrínsecos quanto extrínsecos. Uma melhor compreensão da dinâmica de interação entre as respostas ao estresse e o envelhecimento é fundamental para desenvolver novas estratégias para combater o estresse endógeno e reduzir os danos associados ao envelhecimento (NIKOS & NEKTARIOS, 2011).

Para melhor compreender o envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae* é preciso destacar que essas células possuem dois tipos de envelhecimento, conhecidos como tempo de vida replicativo e cronológico. O tempo de vida replicativo (RLS) envolve a atividade mitótica das células onde o tempo de vida de uma célula-mãe é definido pelo número de células-filhas geradas antes da senescência. Dessa forma, o tempo de vida máximo de uma levedura em particular corresponde ao alto número de divisões que ela pode sofrer (KAEBERLEIN, 2010; FELDMANN, 2012). O tempo de vida cronológico (CLS) pode ser definido como a alta capacidade das leveduras sobreviverem após entrar em um estado de quiescência, também conhecido como fase estacionária ou G₀. G₀ é uma fase específica em que o ciclo celular encontra-se

praticamente parado, e em microorganismos eucariontes esse processo é induzido pela limitação de nutrientes no meio (BURHANS & WEINBERGER, 2007; HOHMANN & MAGER, 2003). No decorrer do envelhecimento cronológico ocorrem danos às mitocôndrias e proteínas muito oxidadas se acumulam contribuindo para a senescência da célula. Esses danos podem acumular-se mesmo a célula encontrando-se em fase G₀, de forma tal que atinja um limite em que o microorganismo não consiga mais reiniciar novamente o ciclo celular. Além disso, estudos têm mostrado que o CLS tem impacto sobre o RLS. Como mostra a Figura 1, durante o envelhecimento replicativo as células-mães saudáveis possuem a capacidade de reter para si os danos acumulados não os transmitindo para as suas filhas, porém, células-mães muito velhas possuem uma menor capacidade de reter para si essas injúrias podendo transmitir as suas filhas danos suficientes para provocar um envelhecimento prematuro dessas novas células.

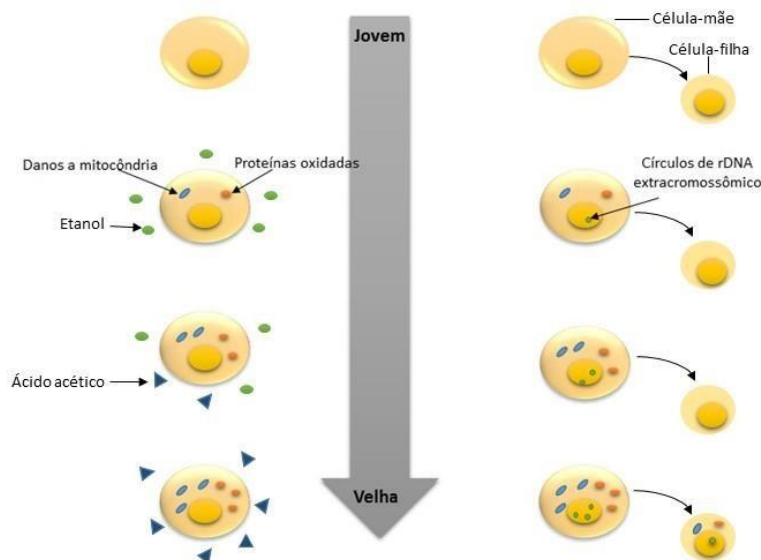


Figura 1: Esquema dos danos acumulados durante o envelhecimento em leveduras: os danos se acumulam nas células em G₀ durante o envelhecimento cronológico. No meio externo, o etanol se acumula e inicialmente é convertido em ácido acético, que induz uma resposta semelhante a apoptose e morte celular. No envelhecimento replicativo, o dano é retido pela célula-mãe e removido da célula-filha. Círculos de DNA extracromossômicos ribossomais nucleares, proteínas citoplasmáticas oxidadas e mitocôndrias danificadas podem contribuir para a senescência replicativa. Em células-mãe muito velhas, a assimetria se rompe e a célula filha pode herdar dano suficiente para tornar-se prematuramente envelhecida (Adaptado: KAEBERLEIN, 2010).

Apesar da importância dos fatores genéticos e cronológicos, fatores ambientais também contribuem significativamente para determinar o curso e duração desse tempo de vida (FELDMANN, 2012; KAEBERLEIN, 2010). Através de estudos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* é possível compreender que o processo de envelhecimento está fortemente relacionado à capacidade dessas células adaptarem-se a ambientes hostis por longos períodos e, mesmo assim, serem capazes de reiniciar o processo proliferativo quando reinseridas em condições favoráveis (VÁCHOVÁ *et al.*, 2012).

1.3. INSTABILIDADE GENÔMICA NO ENVELHECIMENTO

A instabilidade genômica é um componente fundamental do envelhecimento em eucariontes. Estudos apontam que essa instabilidade aumenta com a idade, porém a forma como isso ocorre ainda não está clara, mas se aceita a teoria da produção de radicais livres, os danos oxidativos ao DNA e a outros constituintes celulares como reconhecidos determinantes primários do envelhecimento (BURHANS & WEINBERGER, 2007).

Muito se tem demonstrado que o envelhecimento está acompanhado do aumento de danos ao DNA e instabilidade genômica desde organismos modelo até os humanos. Com base nessas evidências numerosas doenças e síndromes raras progridem como as síndromes de Werner e Bloom, as quais estão associadas ao acúmulo de danos ao DNA e provocam sinais de envelhecimento precoce em humanos (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2014).

Naturalmente, os danos ocorrem no decorrer do tempo de vida e tem como causas fatores internos e externos. As causas internas incluem: mutações, rupturas, duplicações e realocações de partes do DNA, incapacidade para corrigir erros que surgem a partir da replicação do DNA. Já as causas externas estão relacionadas com: fatores físicos, químicos ou de natureza biológica. Sendo assim, muitos estudos demonstram que a indução experimental de danos ao DNA resulta na aceleração do envelhecimento e comprometimento da longevidade (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2014).

Atualmente, é aceito que a instabilidade genômica, a redução dos telômeros e a apoptose estão diretamente relacionados ao metabolismo oxidativo e a instabilidade desse processo é induzido por ROS (espécies reativas de oxigênio). Quando em instabilidade, as células podem ser conduzidas a apresentarem fenótipos de envelhecimento prematuro. Para compreender a base da aceleração do envelhecimento é importante considerar as mudanças moleculares que resultam de defeitos na manutenção genômica (HASTY *et al.*, 2003).

Defeitos nos mecanismos de manutenção genômica são à base de muitas doenças, sugerindo que os danos ao DNA, tais como os acumulados durante o envelhecimento normal, contribuem para as deteriorações relacionadas à idade.

Além disso, os mecanismos de reparo são sujeitos a modificações ao longo da vida de uma célula ocorrendo uma perda gradual da eficiência desses mecanismos (KOURTIS & TAVERNARAKIS, 2011).

Um declínio geral dos processos de transcrição ocorre com o avançar da idade, e isso tem como consequência a inadequada reparação de danos ao DNA. Como se sabe, danos não reparados adequadamente ocasionam mutações que podem levar ao crescimento proliferativo celular descontrolado. Sendo assim, se a instabilidade genômica leva a aceleração do envelhecimento, possivelmente, o envelhecimento seja primariamente causado pelo reparo inadequado dos danos ao DNA, geralmente ocasionados por danos oxidativos (HASTY *et al.*, 2003).

1.4. O ESTRESSE

O estresse pode ser definido como uma tensão ocasionada por mudanças ambientais que tende a provocar deformações estruturais e/ou alterações funcionais na célula. De uma forma geral, todos os seres vivos estão destinados ao crescimento e metabolismo ou expostos a mudanças ambientais de natureza física ou química, onde sobreviver torna-se um desafio (HOHMANN & MAGER, 2003). Células saudáveis utilizam mecanismos complexos para responder com

eficiência aos estresses aos quais são expostas, realocando recursos para as defesas através da parada do ciclo celular (HO & GASCH, 2015).

Os organismos vivos necessitam de condições internas favoráveis para manter suas funções básicas de crescimento e reprodução. Sendo assim, utilizam de várias estratégias para preservar essas funções mediante variações do meio externo. Organismos multicelulares são providos de órgãos e tecidos especializados para garantir uma relativa estabilidade interna, em contrapartida, microorganismo unicelulares, tais como, a levedura *S. cerevisiae* possui mecanismos próprios para se adaptar a drásticas mudanças ambientais como: variação de tipos e quantidades de nutrientes, osmolaridade e acidez do meio, extremos de temperatura, radiação e elementos tóxicos. Quando expostas a mudanças ambientais abruptas as células rapidamente procuram se ajustar e adaptar-se na tentativa de sobreviver (GASH *et al.*, 2000).

O estresse oxidativo, que será um dos itens analisados nesse trabalho, é o termo utilizado para o estresse que provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A bioquímica e a biologia molecular se ocupam em estudar a forma como os organismos respondem e se auto protegem da geração de ROS. As espécies reativas de oxigênio (Figura 2) são moléculas altamente instáveis que carregam um ou dois elétrons não pareados. Essas moléculas podem ser estabilizadas através da remoção dos elétrons de outras moléculas provocando uma desestabilização da molécula doadora (HOHMANN & MAGER, 2003).

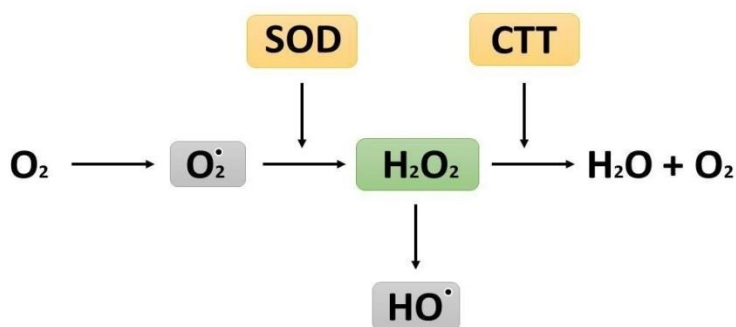


Figura 2: Esquema da formação das ROS. A formação do ânion superóxido (O_2^-), é passível de neutralização parcial pela enzima superóxido dismutase (SOD) que produz H_2O_2 , menos reativo. Entretanto, havendo excesso de O_2^- , haverá maior exigência de catalase (CTT). Isso pode acarretar em deficiência momentânea de CTT, levando ao acúmulo de H_2O_2 , matéria prima para a formação da ROS mais agressiva: HO^\bullet (Adaptado: Ribeiro *et al.*, 2005).

O excesso de ROS pode ser combatido pelos antioxidantes, estes são substâncias produzidas pelo próprio organismo que quando presente em menor concentração comparado ao substrato oxidável regenera-o ou previne a oxidação do mesmo. As catalases e as superóxido dismutases (Figura 2), além da glutatiónasuperoxidase são exemplos desses antioxidantes e sua atividade inclui retardar o envelhecimento e doenças relacionadas a danos oxidativos (BARREIROS *et al.*, 2006).

Parece existir uma forte relação entre a ativação de vias de resposta ao estresse e longevidade com o impacto que o envelhecimento acarreta sobre a eficácia dos mecanismos de resposta ao estresse. Manter a eficiência desses mecanismos de resposta ao estresse pode ser uma estratégia potencial para prolongar a longevidade, retardar o envelhecimento e o surgimento das doenças associadas à idade (KOURTIS & TAVERNARAKIS, 2011).

O uso de microorganismos como sistema modelo para estudar as respostas ao estresse oxidativo sem dúvida tem uma importante influência para entender os mecanismos pelos quais os eucariontes superiores lidam com o estresse oxidativo. Isto é muito importante nas ciências biomédicas desde o momento em que os danos oxidativos começaram a ser associados às doenças neurodegenerativas, circulatórias, câncer e envelhecimento (HOHMANN & MAGER, 2003).

1.4.1. A Alta Pressão Hidrostática como modelo de estresse

A pressão hidrostática é uma variável da termodinâmica que mede a alta pressão nas profundezas dos oceanos que varia em valores entre 0.1 a 110 MPa (MegaPascal). Acontece que alguns organismos vivos são capazes de resistir em ambientes com pressões muito elevadas apesar de sofrerem grandes alterações estruturais e de suas funções bioquímicas e biomoleculares (DOMITROVIC *et al.*, 2003).

O fato dos organismos vivos serem continuamente desafiados por mudanças ambientais tem favorecido a evolução em adaptações fisiológicas para lidar com tais mudanças. Estes mecanismos incluem, por exemplo, fatores fisiológicos,

bioquímicos, moleculares e fenotípicos. A forma mais comum de se estudar essas alterações se dá em proporcionar um ambiente perturbador por meio do estresse osmótico, oxidativo e térmico. Diante dessa perspectiva de análise, a alta pressão hidrostática (HHP) se torna um importante modelo de estresse por provocar estresse oxidativo em organismo modelo como a *Saccharomyces cerevisiae* (RIDDHIMAN, 2012; BRAVIM *et al.*, 2012).

A aplicabilidade inicial da HHP se deu por interesses comerciais e industriais como a esterilização em processos de pasteurização não térmica com a extensão de validade de produtos alimentícios sem substanciais modificações das propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos. Mas, outra aplicação potencial está relacionada com a utilização de altas pressões subletais em biotecnologia microbiana com microorganismos tolerantes, que não só pode ser útil para estudar a adaptações a ambientes hostis, mas pode também contribuir para o desenvolvimento de aplicações em biociências (SARAIVA *et al.*, 2013).

Estudos realizados com *S. cerevisiae* submetidas a um tratamento de HHP em nível subletal, correspondente a 50 Mpa por 30 min (50 MegaPascal por 30 minutos) seguido de um intervalo de recuperação de 15 min em pressão atmosférica de 1 ATM ou 0,1 MPa mostrou que essas células adquirem maior tolerância para suportar um estresse que antes seria letal ou que permitiria uma sobrevivência bem menor dessa população (BRAVIM *et al.*, 2012).

Atualmente, a HHP é utilizada como ferramenta biotecnológica com aplicabilidade em modulação de atividades enzimáticas, desagregação de proteínas, preparo de vacinas virais, na engenharia de plantas e tecidos animais, dentre outros. A alta pressão provoca efeitos e respostas similares a outros estresses ambientais. Em primeiro instante, esse tratamento resulta em compactação estrutural e biomolecular da célula, e como resultado dessas alterações ocorre ativação ou inibição de reações bioquímicas em resposta à redução do volume celular. A HHP altera a conformação da membrana celular, ativa defesa antioxidante e estimula proteção cruzada contra outros tipos de estresses como calor, frio e etílico (PALHANO, 2008).

1.4.2. Efeitos da HHP em *S. cerevisiae*

Os seres vivos chamados piezofílicos são aqueles que possuem uma ótima taxa de crescimento e proliferação em pressão atmosférica de 1 ATM ou 0,1 MPa, efeitos inibitórios quando o nível de pressão excede 100 MPa, e injúria não letal das membranas em níveis abaixo de 200 MPa. Sabe-se que os microorganismos são gradualmente afetados pelo aumento dos níveis de pressão (OGER & JEBBAR, 2010).

Estudos mostram que a HHP afeta primariamente as funções da membrana celular através da inativação de proteínas de membrana (HARTMANN *et al.*, 2006). As estruturas membranosas são bastante sensíveis à elevação da pressão e os lipídeos tendem a perder a funcionalidade de permeabilidade, fluidez e movimentação de proteínas. Já na camada bilipídica ocorre a insaturação dos lipídeos provocando deformidades que dificultam a passagem das moléculas de água para o interior da célula, levando a um aumento da resistência à pressão e a baixa temperatura (OGER & JEBBAR, 2010; FERNANDES, 2005).

A HHP afeta a polimerização das proteínas induzindo a desnaturação e interferindo na atividade enzimática que tende a ser reduzida pelo aumento dos níveis de pressão dependendo da atividade celular no momento. Altera também a arquitetura e a estrutura da parede celular e das organelas, inibe o processo de divisão e a fluidez da membrana (FERNANDES, 2005; OGER & JEBBAR, 2010).

Os efeitos e respostas ao estresse de pressão sobre o ciclo celular também tem sido observado em células humanas, na qual a mitose pode ser reversivelmente parada por altas concentrações de óxido nítrico (VINOJ *et al.*, 2007). A pressão também provoca mudanças na molécula de DNA, que é estabilizada e a transição da cadeia dupla para cadeia simples necessária para os processos de replicação, transcrição e tradução torna-se mais difícil. Além disso, pode provocar múltiplas desintegrações das subunidades ribossômicas, o que tem

sido uma das principais causas da morte celular por altas pressões (SARAIVA *et al.*, 2013; NIVEN *et al.*, 1999).

1.4.3. Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* a HHP

A sobrevivência celular está ligada a sua capacidade de perceber e responder a alterações do ambiente externo de forma a se adaptar a uma nova situação. Os eucariontes unicelulares como *S. cerevisiae* precisam se adaptar a constantes mudanças ambientais para conseguir manter sua taxa de proliferação em níveis normais. As alterações químicas e físicas aos quais estes microorganismos são expostos fazem com que seus mecanismos moleculares imponham um efeito negativo sobre o rápido crescimento e proliferação celular. A esses mecanismos induzidos pela exposição a condições adversas atribui-se a chamada resposta ao estresse (HOHMANN & MAGER, 2003).

Os mecanismos de resposta ao estresse atuam com a finalidade de proteger as células de danos moleculares através da ativação de mecanismos de reparo. A resposta ao estresse direciona a célula a um ajuste metabólico para sobreviver à nova condição. Esses mecanismos também levam a aquisição de tolerância com o propósito de deixar a célula preparada para prevenir novos danos se novamente expostas a alterações das condições ambientais. Assim, como mostra a Figura 3, o resultado da resposta ao estresse, quando não letal, é o aumento da produção de proteínas com níveis ou atividades diferentes aos anteriores da exposição ao estresse (HOHMANN & MAGER, 2003).

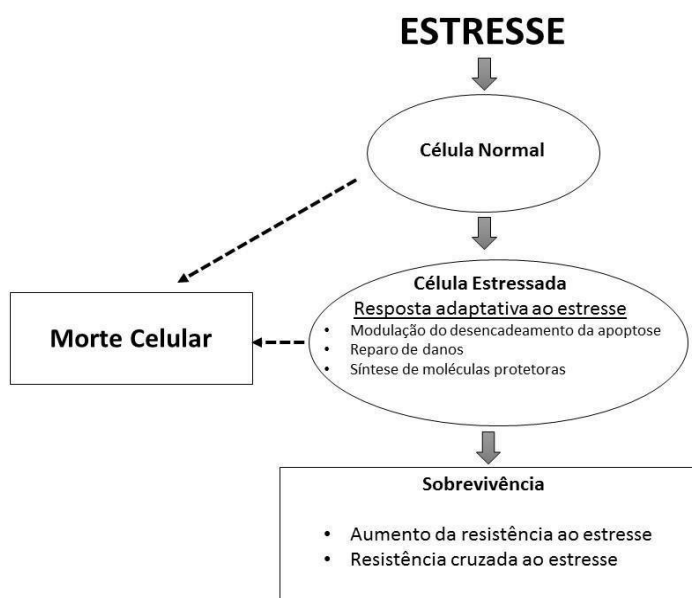


Figura 3: Esquema da resposta adaptativa ao estresse. Respostas ao estresse são mecanismos de adaptação para superar o estímulo estressor. Através dele, as células podem se recuperar de danos estruturais ou serem conduzidas a morte celular. A resposta a um estresse moderado pode resultar em um aumento das defesas e reparos e provocar resistência cruzada a múltiplos estressores. Este estado é chamado de resposta adaptativa ao estresse e é alcançado através de vários mecanismos, incluindo modulação de acionamento de apoptose, reparo de danos e síntese de moléculas protetoras. As setas em linha contínua apontam para o resultado positivo, setas pontilhadas para o negativo (Adaptado: MILISAV *et al.*, 2012).

Uma robusta reprogramação transcricional de centenas de genes acontece para tentar manter a viabilidade celular nas novas condições ambientais. Os fatores de transcrição são de fundamental importância na atividade celular, pois controlam a expressão de genes específicos em resposta ao estresse ambiental (BRAVIM *et al.*, 2013).

Análises ao nível molecular mostram que a HHP ativa fatores transcricionais envolvidos com a expressão de genes de crescimento e adaptação ao estresse, ciclo celular e metabolismo energético. O perfil de resposta transcricional sugere que a regulação de grupos de genes segue uma linha de prioridade. Os genes correspondentes a reparação ou modificação de membranas, mitocôndrias, vacúolo, assim como os relacionados com a agregação de proteção foram imediatamente regulados, outros grupos de genes do stress, por exemplo, os

que codificam proteínas de membrana, dobramento de proteínas, respiração celular e formação de esporos foram regulados 15 minutos mais tarde (BRAVIM, 2012).

A capacidade de se adaptar ao estresse por HHP diminui com o aumento da pressão e este efeito é mais evidente quando se atinge valores superior a 100 MPa. O tempo de pressão e a fase de crescimento da célula também influenciam a tolerância à pressão, de forma que a fase proliferativa corresponde ao momento em que as leveduras são mais sensíveis, e a fase estacionária ao momento em que são mais resistentes ao estresse (DANIEL *et al.*, 2006).

Um pré-tratamento de 50 MPa por 30 min aumentou a sobrevivência de células de *S. cerevisiae* contra tratamentos mais fortes de 100, 150 e 200 MPa, e também contra fortes tratamentos de calor, estresse oxidativo, etanol e choque frio. Isso demonstra que o pré-tratamento induz resistência a estresses mais severos, além de também promover proteção cruzada contra outros estresses (DOMITROVIC, 2006).

1.5. GENES ENVOLVIDOS COM LONGEVIDADE

O perfil de expressão gênica em resposta a HHP revela que a maioria dos genes altamente expressos está envolvida com as defesas ao estresse e com o metabolismo de carboidratos. Em relação ao estresse oxidativo pode-se observar alterações dos níveis de ROS e defesas antioxidantes. As superóxido dismutases (*SODs*) e as catalases (*CTTs*) são algumas das enzimas com ações antioxidantes que atuam para reduzir os danos oxidativos no interior das células (FERNANDES, 2004; RATTANAWONG *et al.*, 2015).

Já as ROS são pró-oxidantes gerados como produtos da cadeia respiratória que induzem danos a macromoléculas essenciais como proteínas, lipídios e DNA. As *SODs* convertem ânions superóxidos (O_2^-) altamente reativos em peróxido

de hidrogênio H_2O_2 , e então, as *CTTs* agem convertendo os H_2O_2 em $H_2O + O_2$ (Figura 2), impedindo que as moléculas nocivas ataquem as que são essenciais ao bom funcionamento da célula (RATTANAWONG *et al.*, 2015).

Dentre os genes envolvidos com longevidade ou extensão do tempo de vida podemos citar o *SIR2* e *SGS1*. *SIR2* é um gene que induz a produção de proteínas sirtuínas. As sirtuínas pertencem a uma família filogeneticamente conservada de proteínas desacetilases dependente de NAD^+ que consomem uma molécula de NAD^+ para cada cadeia lateral de lisina desacetilada. A exigência de NAD^+ torna *SIR2* potencialmente propenso a regulação por flutuações nos níveis de NAD^+ ou de intermediários do metabolismo celular. *SIR2* é considerado um fator de pró-longevidade para o RLS em *S. cerevisiae*, pois a sua deleção reduz o RLS, enquanto que o aumento de sua expressão provoca extensão. Este gene também tem sido implicado como um mediador dos efeitos benéficos da restrição calórica em leveduras e também em eucariontes superiores (WIERMAN & SMITH, 2014).

SGS1 induz a produção de proteínas Sgs1p, que em *S. cerevisiae* são membros de RecQ-helicases, enzimas necessárias ao reparo de danos ao DNA. Defeitos em RecQ-helicases resulta em fenótipos de envelhecimento prematuro em leveduras e humanos, em que nas primeiras, parecem resultar de estresses replicativos. Similar ao *WRN* em humanos (que provoca síndrome de Werner ou envelhecimento precoce), mutações em *SGS1* reduz em 40% o tempo de vida em leveduras, sugerindo que os mecanismos moleculares do envelhecimento celular podem estar evolutivamente conservados. O processo de envelhecimento em leveduras está acompanhado por mudanças morfológicas, incluindo aumento do tamanho celular, esterilidade e aumento e fragmentação dos nucléolos (RINGVOLL *et al.*, 2007).

SCH9 e *TOR1* possuem ortólogos em mamíferos que elucidam mecanismos conservados envolvidos com envelhecimento e doenças relacionadas a idade. *SCH9* produz proteínas quinases, responsáveis por processos de fosforilação oxidativa, e são substratos adjuvantes dos alvos da rapamicina (*mTOR*). Esses dois genes são importantes para regular o crescimento celular em resposta aos nutrientes, ao estresse e ao envelhecimento cronológico (SWINNEN *et al.*,

2014). A vida útil mais longa se dá em parte devido a uma redução na atividade da proteína quinase *SCH9* e uma consequente redução das mutações e rearranjos cromossômicos com maior resistência ao estresse (DICKSON & HUANG, 2012).

TOR é um regulador transcricional que induz diversos genes de resposta ao estresse, crescimento e proliferação. Também é sensível a diversos fatores de estresse, tais como hipóxia, danos ao DNA, estresse oxidativo e osmótico. Seu papel central regulador se dá por sua capacidade em ativar a biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios em resposta aos sinais promotores de crescimento (ARAMBURU *et al.*, 2012). A inibição dos sinalizadores de *mTOR* pode estender o tempo de vida de vários organismos apesar do mecanismo exato desses efeitos permanecerem desconhecidos (FINKEL, 2015).

O gene *RAS* também pode influenciar o tempo de vida em eucariotos, ele ativa a produção de proteínas *Rasp* que são membros de uma grande família de pequenas GTPases que transmitem sinais a partir da superfície celular do receptor de tirosinaquinase para ativar várias vias de sinalização celular. Logo, essas proteínas ocupam uma posição importante no controle de numerosos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, senescência e metabolismo. A hiperativação de *RAS* é altamente oncogênica e a sua deleção em leveduras tem mostrado estender o RLC. Experimentos em outros organismos modelos indicam que esta função pró-longevidade da inibição de *RAS* também pode estar conservada entre os demais eucariontes (PARTRIDGE *et al.*, 2015).

Desta forma, esse trabalho poderá ajudar a compreender se a longevidade pode favorecer a resposta ao estresse. E assim, contribuir para avanços nos estudos sobre os mecanismos de adaptação ao estresse, longevidade e envelhecimento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da alta pressão hidrostática na sobrevivência e longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência de células de *S. cerevisiae* à HHP;
- Comparar a sobrevivência de células-mães e células-filhas à HHP;
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento de HHP subletal;
- Analisar a expressão de genes envolvidos com longevidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram utilizadas duas cepas laboratoriais, ambas haploides. A cepa laboratorial parental do tipo selvagem S288C foi selecionada na biblioteca do Laboratório de Biotecnologia Aplicado ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo. A cepa UCC5181 é resultante de uma modificação genética da sua parental S288C, a qual foi gentilmente cedida pelos pesquisadores *Gottschling* e *Lindstrom* da *Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington*, em 2015. Essa cepa sofreu uma modificação genética que permite a esterilidade de células-filhas recém-nascidas em meio contendo estradiol sem que isso afete a replicação das células-mães.

As células de levedura foram cultivadas em meio YEPD (Extrato de levedura, peptona e dextrose) contendo 20% (p/v) de glicose, 20% (p/v) de peptona, e 10% (p/v) de extrato de levedura, e incubadas a 28 °C e 160 r.p.m (rotações por minuto) de agitação até a fase logarítmica de crescimento, por cerca de 18 hs, para os experimentos de estresse com pressão hidrostática e posterior avaliação de sobrevivência e análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

Para os testes de sobrevivência, utilizou-se meio de cultura com os mesmos critérios descritos acima, adicionado de agarose 10% (p/v). Após o tratamento e diluições seriadas apropriadas, o inóculo foi disperso sobre o meio de cultura YEPD sólido e incubado sob 28°C por pelo menos 72 hs.

3.2. TRATAMENTO POR HHP

As cepas S288C e UCC5181 foram inoculadas em meio de cultura YEPD líquido, incubadas em média por 18 hs sob agitação de 160 r.p.m à 28°C até que alcançassem uma densidade óptica ($D.O_{600nm}$) de aproximadamente 0,7. As células foram então centrifugadas e o “*pellet*” adicionado a novo meio YEPD líquido pré-aquecido. Ao novo inoculo da cepa UCC5181 foi adicionado estradiol a uma concentração final de 1 μ M e, assim, foram incubados sob agitação e aquecimento até que alcançassem uma $D.O_{600nm}$ entre 1,2 a 1,5.

O inoculo de levedura em fase logarítmica de crescimento foi adicionado em um tubo de teflon hermeticamente fechado e inserido no interior do cilindro de pistão de aço (Eureka, MG, Brasil). A pressão interna foi mensurada por um manômetro mecânico calibrado (Woler Brasileira, MG, Brasil). A vantagem desse método de pressurização é que a pressão aplicada pode ser mantida pelo conjunto de engrenagens que a compõe.

As cepas S288C e UCC5181 foram primeiramente submetidas ao tratamento severo de 100 MPa por 30 min para análise da sobrevivência. Em um segundo momento, as células foram submetidas ao tratamento subletal de 50 MPa por 30 min, aguardando-se um período de 15 min à pressão atmosférica de 0,1 MPa sob agitação e aquecimento para em seguida serem submetidas ao estresse severo de 100 MPa por 30 min. Uma alíquota de 100 μ L foi retirada dos controles e tratados, e após diluições seriadas apropriadas foram plaqueadas em *placas de petri* contendo meio de cultura YEPD sólido.

Ao teste com a cepa UCC5181 também foram preparadas placas contendo estradiol à concentração final de 1 μ M. Após 72 hs (para placas sem estradiol) e 96 hs (para as placas com estradiol) contou-se as unidades formadoras de colônias (U.F.C) que surgiram, sendo considerado confiáveis para a diluição aplicada valores entre 30 a 300 U.F.C. Os testes foram realizados pelo menos três vezes e em duplicata. E logo, foi possível observar o crescimento de colônias formadas somente a partir de células-mães.

Para aplicar o piezotratamento em células-filhas foi preparado um inoculo sob as mesmas condições relatadas acima. Ao alcançar uma $D.O_{600nm}$ de aproximadamente 0,7, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão fosfato-salino (PBS) mais biotina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) por 30 min e depois marcadas com microesferas magnéticas contendo estreptavidina (Miltenyi Biotec, Massachusetts, EUA) por mais 30 minutos (Figura 4). As células marcadas foram reinoculadas em novo meio de cultura contendo estradiol $1\mu M$ para a replicação de pelo menos uma geração de células-filhas estéreis e alcance da fase logarítmica de crescimento $D.O_{600nm}$ entre 1,0 a 1,5. As células foram então separadas por cromatografia de afinidade, sendo aplicado às células-filhas o piezotratamento com posterior plaqueamento em YEPD sólido. Aguardou-se 72 hs para a contagem das colônias formadas a partir de células-filhas.

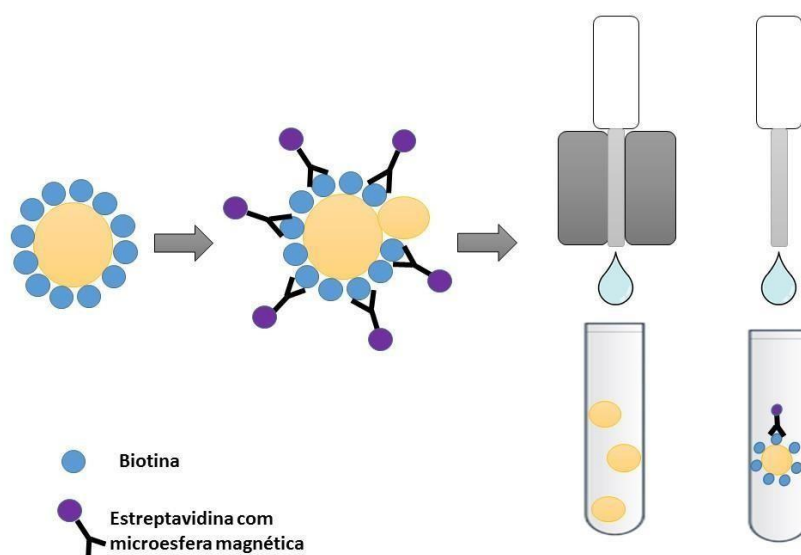


Figura 4: Esquema da biotilação de superfície celular. As células-mães têm sua superfície celular marcada com biotina. Depois, as moléculas de estreptavidina se ligam às moléculas de biotina. A estreptavidina está ligada a microesferas magnéticas, que ao passar por um campo magnético ficam retidas, enquanto que as células-filhas que não foram marcadas eluem para um tubo de ensaio. Após a eluição das células-filhas retira-se a coluna magnética do campo magnético para eluir as células-mães.

3.3. PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-MÃES E TRATAMENTO POR HHP

Para a separação de células-mães e filhas após o tratamento com HHP a cepa UCC5181 foi inoculada e incubada por cerca de 18hs até que alcançasse uma $D.O_{600nm}$ em torno de 0,7. As células foram então centrifugadas e lavadas com PBS e marcadas com biotina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil). A amostra foi novamente lavada com tampão PBS e inoculada em novo meio de cultura contendo β -estradiol (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) a uma concentração final de $1\mu M$. As células marcadas com biotina continuaram a replicar-se por mais 2 hs ou até que alcançasse a $D.O_{600nm}$ entre 1,2 a 1,5 (fase logarítmica de crescimento), gerando células-filhas não marcadas e estéreis. As células foram então pré-tratadas com HHP subletal de 50 MPa por 30 min, incubadas por 15 min em pressão ambiente, sob agitação e aquecimento, e em seguida receberam o tratamento severo de 100 MPa por 30 min.

Finalizado o piezotratamento, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo, centrifugadas a $4^{\circ}C$, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4%. Seguente a esse procedimento, as amostras foram adicionadas a PBS contendo microesferas magnéticas ligadas a estreptavidina, que se ligam à superfície celular das células-mães anteriormente marcadas com biotina. Após essa marcação, as amostras foram lavadas novamente com PBS para retirada de moléculas não ligadas e seguiu-se à separação das células-mães das filhas por cromatografia de afinidade, utilizando a o Kit *Macs Multistand* e colunas magnéticas para separação (Miltenyi Biotec, Massachusetts, EUA). Trata-se de uma estante magnética, na qual se insere uma coluna que contém pequenas esferas magnéticas nas quais ficarão retidas as células-mães que foram marcadas com biotina + estreptavidina, enquanto que as células filhas são eluídas e coletadas em um tubo de ensaio (Figura 4). Após a eluição das células-filhas, a coluna é retirada do campo magnético e lavada com PBS para eluir as células-mães que ficaram retidas. As células separadas foram armazenadas em freezer a $-20^{\circ}C$ para posterior extração de RNA mensageiro.

3.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Para analisar a expressão de alguns genes relacionados com longevidade, envelhecimento e resposta da célula ao estresse após o tratamento de pressão hidrostática, foi realizada análise de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Os genes escolhidos, bem como a sequência e o tamanho de cada fragmento estão descritos na Tabela 1. O gene ALG9 foi utilizado como gene de referência.

Após o tratamento de pressão e separação de células-mães e filhas, as células foram mantidas em freezer a -20°C até o momento da extração de RNA. Para extração de RNA as células foram ressuspensas em tampão AE (50 mM de acetato de sódio, 10 mM de EDTA, pH 5,3) e 10% de SDS (dodecil sulfato sódico). A extração prosseguiu com fenol/clorofórmio e a amostra foi precipitada com acetato de sódio 3 M (molar) e etanol absoluto. Após a extração, seguiu-se a lavagem do RNA com etanol absoluto 99% e ressuspensão com água ultrapura.

A qualidade e quantidade de RNA foram determinadas usando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). Uma alíquota de 1,0 μL de RNA foi submetida às leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e varredura de 220 nm. Os resultados foram avaliados no programa Nanodrop® 2000.

Para remoção de resíduos de DNA genômico, 1 μg de RNA total foram tratados com o kit DNase I (Invitrogen, SP, Brasil) durante 15 min em temperatura ambiente, e para a inativação da enzima foi utilizado 1 μL de *stop solution* (25 mM de EDTA) seguido de incubação por 10 min à 65°C . As amostras de RNA tratadas com DNase I foram submetidas a um PCR (reação em cadeia de polimerase) convencional, seguido por eletroforese em gel de agarose para confirmação da ausência de qualquer tipo de DNA nas alíquotas tratadas.

Procedeu-se à construção do template de DNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life technologies, Massachusetts, EUA). Para isso, foi necessário 2 μL de tampão RT (10X), 0,8 μL de 25x mix de dNTP (100mM), 2 μL de primer randômico (10x) e 1 μL de *Multi Scribe Reverse*

Transcriptase e adicionado água ultrapura para volume final de 10µL. As amostras foram introduzidas em termociclador na seguinte programação: 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 85°C por 5 min, e foram armazenadas à -20°C até sua utilização no PCR em tempo real.

Para a reação do PCR em tempo real utilizou-se o equipamento *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). O volume total de reação foi de 10 µL contendo: 1,0 µL de cDNA (25 µg), 5 µL do kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 0,5 µL de cada primer. 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.

A análise dos dados gerados foi realizada através do software *SDS Software System* (7500 version 2.0.1, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Com o auxílio do software determinou-se o *threshold*, que corresponde a um ponto de referência no qual todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência, ou seja, o ponto onde o corante *SYBR Green* está ligado a todos os DNAs da amostra. Uma vez determinado o *threshold*, foi estabelecido o valor de Ct (do inglês *threshold cycle*) de cada amostra. O valor de Ct serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número do ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido.

A eficiência de cada par de primer (Tabela 1) foi avaliada pelo método de diluição seriada usando um mix de DNA 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 qRT-PCR.

| Gene | Sequência do primer | Tamanho do amplicon (pb) | Eficiência (%) |
|--------------|--|---------------------------------|-----------------------|
| <i>SOD2</i> | Forward: AACCAGGATACCGTCACAGG Reverse: TTCCAGTTGACCACATTCCA | 130 | 95 |
| <i>CTT1</i> | Forward: ACGGCCCTATCTTACTGAA Reverse: TACACGCTCCGGAACCTTT | 79 | 95 |
| <i>SGS1</i> | Forward: GGCAGGCGGATGAGATACAA Reverse: CACGGCCGGTTTCTTGATA | 134 | 105 |
| <i>SIR2</i> | Forward: TAAAGCTGCGCTCGGAGAA Reverse: CACTGCCAAGGGATCCATGT | 69 | 99 |
| <i>SCH9</i> | Forward: TCCAGCCATGCAAGCAAAG Reverse: TCCCGGGATAAAGGAACCA | 129 | 104 |
| <i>RAS2</i> | Forward: AGGCAACCAGGCGACAAAT Reverse: TGGCCCGTGGAATTGTCTA | 65 | 91 |
| <i>TOR1</i> | Forward: AGATGCTGGGGTCGCAAAA Reverse: AGCATGGGAGGGTGACTCT | 100 | 101 |
| <i>ALG9*</i> | Forward: ACATCGTCGCCCAATAAAT Reverse: GATTGGCTCCGGTACGTAAA | 145 | 96 |

* Gene de referência

Para o desenho dos primers foi utilizado os programas de bioinformática *Primer Express 3.0* (taq® MGB Quantification), *Primer 3 Plus* e o banco de informações genômicas de *Saccharomyces cerevisiae Genome data base*.

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos foram feitos no software *GraphPad Prism* (versão 5.0, GraphPad, Califórnia, EUA) com utilização de média e desvio padrão para as barras de erros. Todos os experimentos foram repetidos três vezes e realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS S288C E UCC5181

Objetivando certificar se a mutação inserida na cepa UCC5181 alteraria ou não os resultados de resposta ao estresse, realizou-se testes sobrevivência e comparou-se os resultados com os da cepa S288C. Em um primeiro momento, as células foram submetidas diretamente a uma pressão severa de 100 MPa por 30 min. Depois, os testes foram realizados submetendo as amostras ao estresse brando de 50 MPa por 30 min, seguido de incubação a pressão ambiente ou 0,1 MPa durante 15 min, para então aplicar o estresse severo de 100 MPa por 30 min. No tratamento de 100 MPa por 30 min, observou-se que ambas as cepas apresentaram cerca de 18 a 22% de sobrevivência. Já no tratamento que inclui estresse brando de 50 MPa por 30 min, mais 15 min de incubação a 0,1 MPa, antes do estresse severo de 100 MPa por 30 min, percebeu-se que as células tiveram um aumento de sobrevivência para taxas em torno de 32 a 36% (Figura 5). Apesar da Figura 5, na barra da direita parecer mostrar que a cepa UCC5181 apresentou uma sobrevivência menor que a S288C, essa disparidade não foi estatisticamente significativa. Essa diferença se mostra pelo fato da escala de sobrevivência considerar valores entre 0 a 40%. Caso a escala abrangesse 100%, essa diferença praticamente não seria notada.

De acordo com trabalhos anteriores, o estresse brando de 50 MPa, seguido por um período de recuperação de 15 min em pressão ambiente confere as células uma melhor capacidade de reagirem a um estresse mais severo (PALHANO *et al.*, 2004a). E isso, mais uma vez pode ser confirmado nesse trabalho. Esse teste também mostrou que a modificação genética de UCC5181 parece não afetar a sua capacidade de responder a HHP em comparação com sua parental.

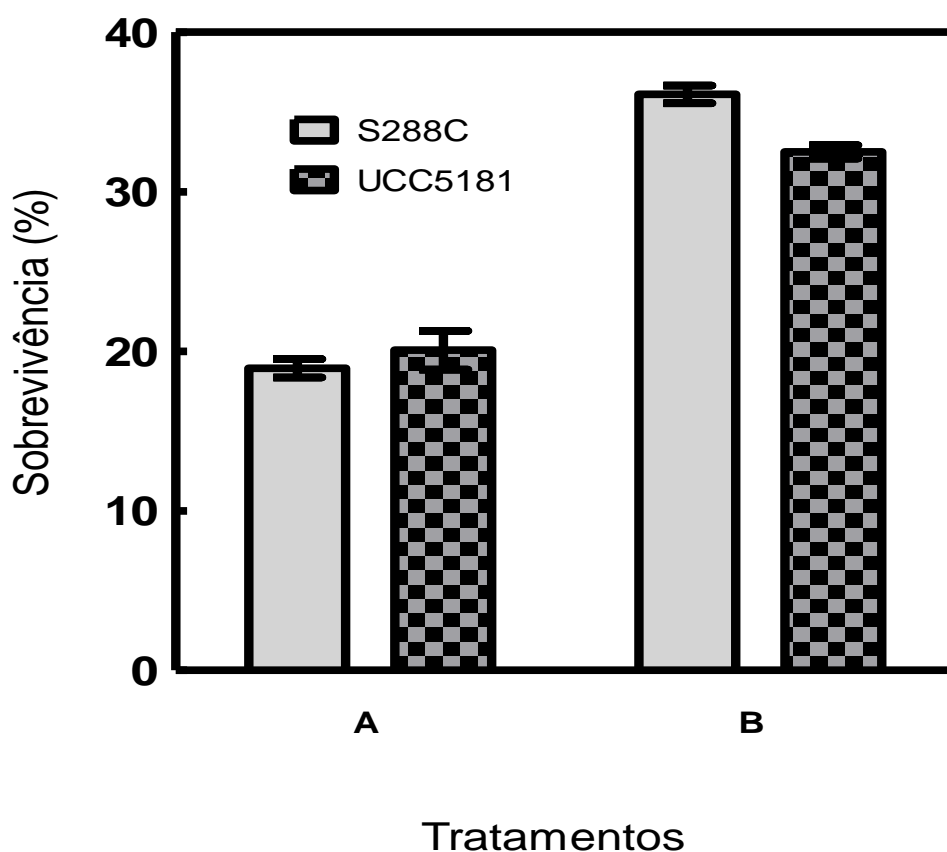


Figura 5: Sobrevivência das cepas S288C e UCC5181 ao tratamento por HHP. (A) Células das duas cepas foram submetidas ao tratamento de 100 MPa por 30 min; (B) Células das duas cepas foram submetidas a 50 MPa por 30min, seguido de incubação a 0,1 MPa por 15 min, e posterior estresse severo de 100 MPa por 30 min. Houve diferença significativa entre os tratamentos A e B ($p < 5$).

4.2. SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-MÃES E CÉLULAS-FILHAS

Células-mães e filhas mostraram respostas diferentes a HHP. Importante salientar que as células-filhas encontravam-se “presas” na fase G1 do ciclo celular, e as células-mães no início dela. G1 é a fase em que as células estão reiniciando o ciclo celular através dos processos iniciais de síntese de DNA, sendo também o momento em que as células se mostram mais sensíveis ao estresse. Ao realizar o teste de sobrevivência que analisa o crescimento de unidades formadoras de colônias (U.F.C) em meio YEPD sólido, observou-se

que a taxa de sobrevivência das células-mães foi em torno de um pouco mais que 60%, enquanto que, na população geral foi em torno de 30% (Figura 6), o que levou ao interesse de investigar também a sobrevivência de células-filhas separadamente. As células-filhas mostraram uma taxa de sobrevivência em torno de 25%, ou seja, menos da metade das células-filhas resistiram a HHP em comparação as células-mães (Figura 6). Isso demonstra que as células-mães podem ter adquirido mecanismos de defesa e, por isso, tornaram-se mais resistentes ao tratamento aplicado.

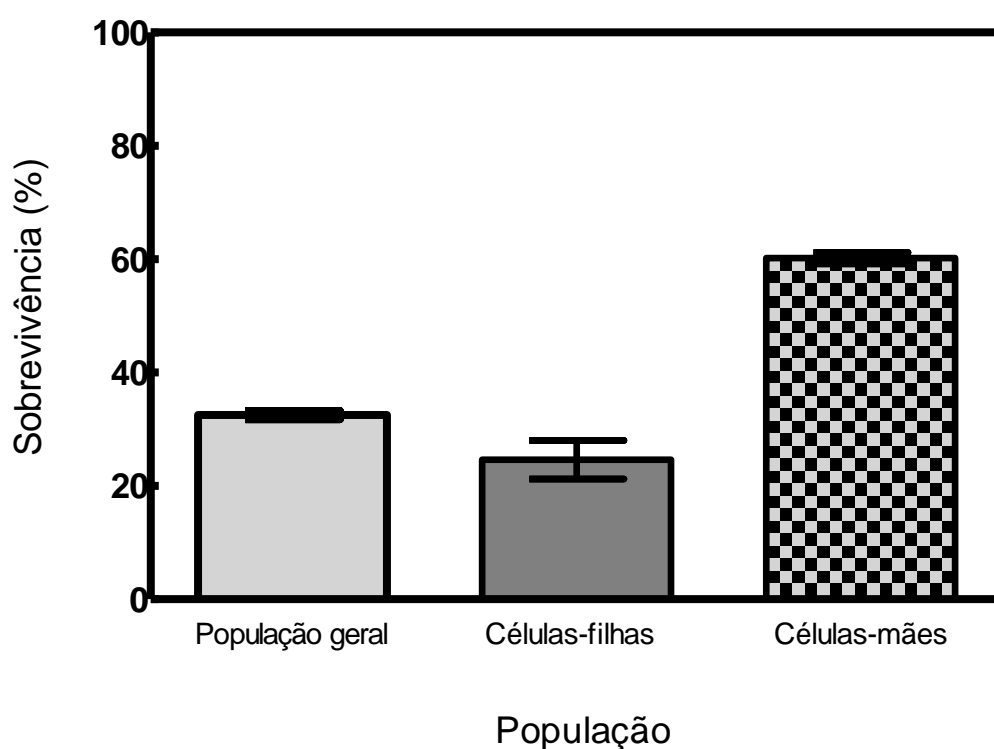


Figura 6: Sobrevivência da população geral, células-filhas e células-mães da cepa UCC5181 ao tratamento de 50 MPa por 30min, seguido de incubação a 0,1 MPa por 15 min, e posterior estresse severo 100 MPa por 30min.

O próprio processo fermentativo gera várias condições estressantes para as leveduras durante o seu crescimento. As variações de nutrientes, temperatura, pH, concentração de etanol e acesso ao oxigênio que ocorrem durante a fermentação são capazes de selecionar, até certo ponto, leveduras mais tolerantes aos estresses ambientais (PALHANO, 2005). É provável que essas condições tenham sido fatores importantes para a maior resistência e

sobrevivência das células mais velhas, já que estas células sofreram mais tempo com essas variações.

São desconhecidas as exatas razões pelas quais, em uma população de células-filhas pertencentes a mesma linhagem e mesma idade, apenas uma média de 25% tenham sobrevivido. Considerando-se que sejam clones, com o mesmo tempo de vida e submetidas as mesmas condições de mudanças ambientais, esperava-se que todas respondessem da mesma forma, o que não ocorreu.

4.3. EXPRESSÃO GÊNICA

Foram selecionados alguns dos principais genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento, a fim de analisar alterações de expressão gênica em células-mães e filhas em resposta a HHP.

Tabela 2: Descrição dos genes utilizados na análise de RT-PCR.

| Genes | Atuação |
|--------------|--|
| <i>SOD2</i> | Sintetiza a superóxido dismutase que protege as células dos danos oxidativos provocados por ânions superóxidos |
| <i>CTT1</i> | Codifica a produção de catalase citoplasmática importante na proteção contra danos oxidativos provocados por H ₂ O ₂ |
| <i>SGS1</i> | Sintetiza RecQ-helicases, importantes no reparo de danos ao DNA e manutenção da integridade genômica |
| <i>SIR2</i> | Codifica a produção de desacetilases de histonas dependentes de NAD ⁺ com papel na manutenção dos telômeros e longevidade |
| <i>SCH9</i> | Sintetiza proteínas quinases, afeta crescimento e longevidade, responde ao estresse por variações ambientais e nutricionais |
| <i>RAS2</i> | Sintetiza proteínas ligantes de GTP, regula crescimento, proliferação e estimula a produção de cAMP |
| <i>TOR1</i> | Alvo da rapamicina, regula crescimento celular, resposta ao estresse, envelhecimento e induz apoptose |

Os genes *SOD2* e *CTT1* são importantes na codificação de enzimas que atuam no processo de transformação de ROS em moléculas mais estáveis. *SOD2* ou superóxido dismutase 2, protege as células contra a toxicidade do oxigênio. Está localizado na matriz mitocondrial e envolvido na detoxificação de radicais de oxigênio. *SOD* catalisa a quebra do radical superóxido (O₂⁻) em uma molécula

de O_2 e H_2O_2 , como mostra a Figura 3 (BERMINGHAN *et al.*, 1988). A deleção de *SOD2* está envolvida na redução da sobrevivência e dos RLC e RLS de leveduras, e sua superexpressão estende a sobrevivência sem afetar taxas metabólicas (LONGO *et al.*, 1996; FABRIZIO & LONGO, 2003).

CTT1 ou catalase citosólica T, tem papel na proteção contra danos oxidativos por converter H_2O_2 em O_2 e H_2O (Figura 2). As catalases atuam na resposta ao estresse oxidativo e protegem as proteínas da inativação oxidativa (LUSHCHAK & GOSPODARYOV, 2005). A atividade da catalase também aumenta durante o estresse oxidativo provocado pelo processo de envelhecimento (GIANNATTASIO *et al.*, 2005).

A análise de *SOD2* e *CTT1* mostrou que esses agentes antioxidantes estavam mais altos nas células mais velhas do que nos controles jovens antes do tratamento (Figura 7), e que a situação mudou após o estresse (Figura 8), passando a duplicar a expressão desses dois genes nas células filhas, ao passo de ter havido pouca alteração nas células-mães. Sabe-se que as catalases e as superóxido dismutases são essenciais para ajudar na remoção de ROS, ajudando a diminuir danos ao DNA, proteínas e a outras moléculas importantes ao bom funcionamento celular.

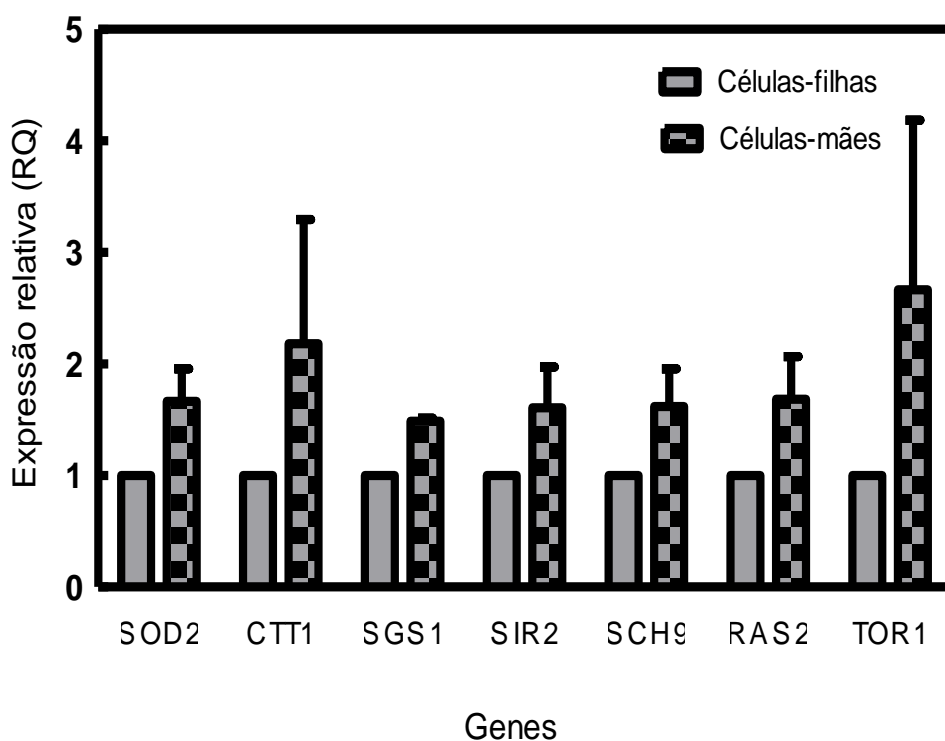


Figura 7: Expressão dos principais genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento em cepas UCC5181 de *S. cerevisiae* sob pressão ambiente. Células-mães não-tratadas foram comparadas a células-filhas não tratadas (referências). A RQ das referências foram setadas em 1.

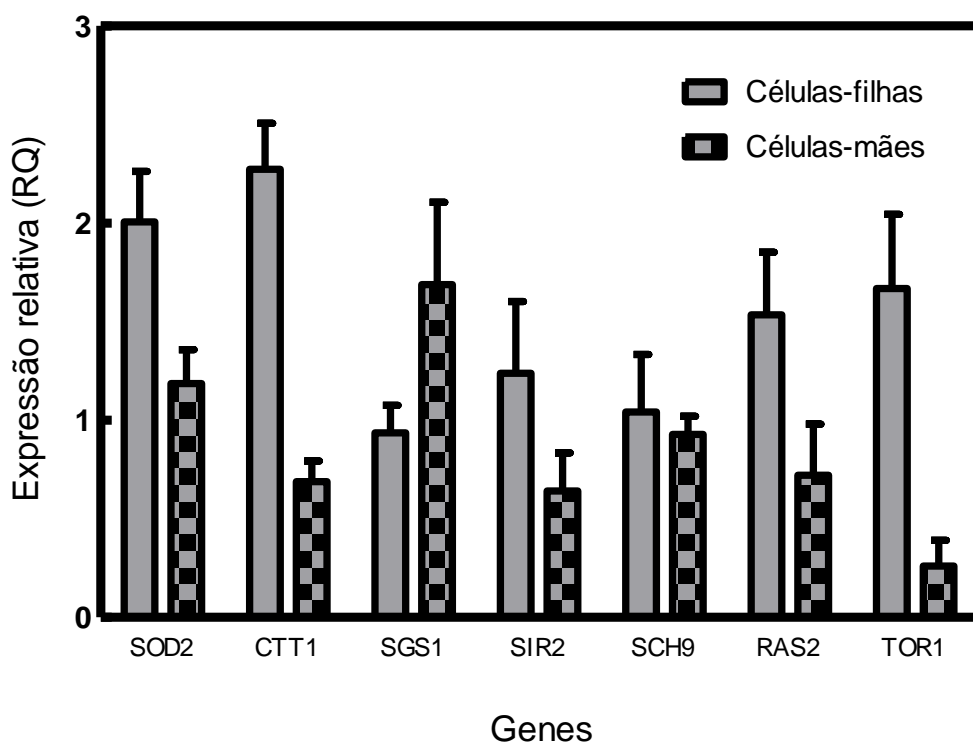


Figura 8: Expressão dos principais genes envolvidos com resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento em cepas UCC5181 de *S. cerevisiae* após HHP de 50 MPa por 30 min, seguido de incubação a 0,1 MPa por 15 min, e posterior estresse severo de 100 MPa por 30 min. As referências foram os controles não tratados de células-filhas e células-mães. A RQ dos controles foram setados em 1.

O aumento de *SOD2* e *CTT1* nas células-filhas demonstra que células jovens possuem mecanismos de defesa rápidos e eficazes para tentar “varrer” os danos antes que estes afetem outras moléculas. Um trabalho realizado por Ruiz *et al.* (2010), sugere que uma das razões para o aumento da produção de ROS se dê por elevação da atividade mitocondrial influenciada pelo aumento dos níveis de cAMP que seria induzido durante o estresse.

Dentro dessa perspectiva, *SOD2* e *CTT1* podem ter sido superexpressos nas células-filhas porque o estresse pode ter induzido a superexpressão de genes reguladores, como *RAS2* (que será mais detalhado posteriormente) que induz o aumento dos níveis de cAMP. O aumento dos níveis de cAMP parece induzir maior atividade do potencial de membrana mitocondrial, e esse aumento do ritmo respiratório pode ser uma explicação para o aumento da produção de ROS (RUIZ *et al.*, 2010). Sendo assim, o aumento da liberação de ROS, poderia justificar a superexpressão dos genes codificadores das catalases e superóxido dismutases, com a finalidade de produzir os antioxidantes para remover essas moléculas nocivas (Figura 9).

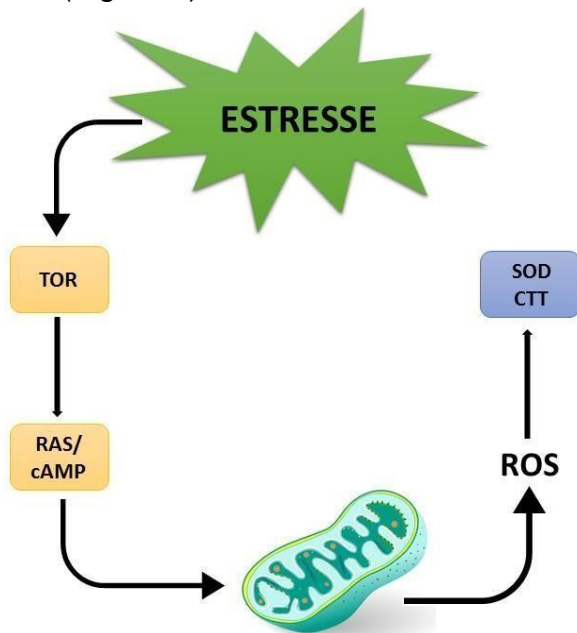


Figura 9: Esquema da possível sinalização do estresse oxidativo envolvendo atividade mitocondrial. O estresse oxidativo provoca alterações que induzem *TOR*, que sinaliza para *RAS/cAMP*, que induz atividade mitocondrial. Logo, as mitocôndrias produzem mais ROS, que induz a expressão de *SODs* e *CTTs*. Se o estímulo inicial superexpressar *TOR*, todo o restante da cadeia tende a ser superexpressada. Se o estímulo inicial reprimir *TOR*, *RAS/cAMP* também será reprimido e o restante da cadeia poderá sofrer redução ou permanecer nos mesmos níveis de expressão de *SOD* e *CTT* por conta de mecanismos ainda não elucidados (Adaptado: RUIZ *et al.*, 2010).

Seguindo a mesma linha de raciocínio de forma inversa para as células-mães, *SOD2* e *CTT1* tiveram alterações pequenas em suas RQs. Esse resultado, possivelmente, pode ter ocorrido porque a atividade mitocondrial pode ter sofrido pouca alteração com o estresse, provavelmente por não receber estímulos significativos de cAMP, pelo fato de *RAS2* ter se mantido em níveis semelhantes aos de antes do tratamento. É possível que esse perfil de expressão esteja envolvido com mecanismos de adaptação. Mais adiante será discutido com maior ênfase esse suposto mecanismo adaptativo das células mais velhas envolvendo os resultados dos genes *SOD2*, *CTT1*, *RAS2* e *TOR1*.

Pesquisas anteriores com *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a HHP como ferramenta para o aumento da produção de etanol mostraram que o estresse induz a produção de catalases e superóxido dismutases. Isso sugeriu que o aumento da produção de etanol em leveduras submetidas a HHP se dá pelo fato desse estresse provocar o aumento de ROS, e conseqüentemente, das defesas antioxidantes, como *SOD2* e *CTT1* fazendo com que as leveduras se tornem mais resistentes. Isso justificaria o aumento da sobrevivência das células e também da produção maior de etanol (MOTA, 2015).

Mas, os novos resultados desse trabalho sugerem que essa maior produção de etanol pode estar mais relacionada com a aceleração do metabolismo dos carboidratos provocado pelo estresse e não pelo aumento da sobrevivência por ação dos antioxidantes. Pois, como podemos observar, a superexpressão de *SOD2* e *CTT1* (Figura 8) ocorreu com grande significância somente nas células-filhas, e estas na verdade, sobreviveram pouco ao estresse. Ao passo que, as células-mães não mostraram alterações significativas da expressão desses genes, e mesmo assim, sobreviveram muito mais.

Testes realizados sem renovação do meio de cultura antes do tratamento, ou seja, com baixa oferta de carboidrato, tiveram como resultado uma taxa muito baixa de sobrevivência. Isso reforça a hipótese de que a maior produção de etanol esteja mesmo relacionada ao metabolismo mais acelerado das células jovens, que está fazendo com que essas células consumam mais glicose, liberando mais etanol. Ao passo que, o aumento da sobrevivência envolvendo

toda a população, esteja na verdade atribuído a maior resistência das células mais velhas.

Os resultados da expressão de genes envolvidos com longevidade, envelhecimento e resposta ao estresse também demonstrou grandes diferenças entre células-mães e filhas. Genes envolvidos com longevidade em *Saccharomyces cerevisiae*, como *SGS1* e *SIR2* foram analisados.

SGS1 pertence à família RecQ-helicases DNA nucleolar, importantes no processo de reparo de danos ao DNA e, conseqüentemente na manutenção da integridade genômica. Em humanos, mutações em proteínas RecQ-helicases estão associadas a predisposição hereditária ao câncer e/ou ao envelhecimento precoce. Em *Saccharomyces cerevisiae*, as RecQ-helicases, quando mutadas, exibem fenótipos associados com alterações em seus homólogos humanos, tais como, instabilidade genômica e envelhecimento precoce (BERNSTEIN *et al.*, 2010).

O gene *SIR2* (regulador de informações de silenciamento) também está envolvido com a extensão do tempo de vida. Estudos genéticos ligados ao envelhecimento envolvendo o gene *SIR* demonstram que, o aumento da expressão desse gene determina a extensão do tempo de vida, em grande parte por reduzirem os efeitos maléficos do acúmulo de círculos de rDNA (DNA ribossomal) extracromossômico, além de regularem o silenciamento genômico dos telômeros. O silenciamento é acionado por desacetilação das histonas pelas desacetilases dependentes de NAD⁺, mecanismos conservados entre homólogos *SIR2* (DEFOSSEZ *et al.*, 2000).

Observando a Figura 8, podemos perceber que *SGS1* e *SIR2* estão mais expressos nas células mães do que nas filhas, antes da HHP. Após o estresse (Figura 8), percebemos que *SGS1* aumentou praticamente em 1 vez a sua expressão nas mães e não foi alterado nas filhas. Uma ligeira redução de *SIR2* nas células-mães não parece significativo.

Se *SGS1* e *SIR2* são considerados promotores de longevidade por repararem danos e/ou prevenirem acúmulo destes, respectivamente. O não estímulo de *SGS1* nas filhas pode ser explicado primeiramente pelo fato de serem ainda

muito jovens e não terem sofrido danos suficientes para ativar esse gene. Pois, a literatura traz informações de que *SGS1* aumenta no decorrer da vida e sofre redução quando se inicia a senescência, ao passo que a sua expressão mais elevada está associada com o aumento da expectativa de vida. Uma segunda razão pode ser associada a boa resposta dos mecanismos de defesa contra ROS intracelular, como o aumento de *CTT1* e *SOD2*, que provavelmente podem ter sintetizado catalases e superóxido dismutases suficientes para remover grande parte das ROS geradas que poderiam afetar o DNA.

O aumento de *SGS1* nas células-mães demonstra que danos ao DNA devem estar sendo gerados, mas também reparados. Como este gene tem sido associado à extensão do tempo de vida ou benefícios à longevidade, é possível que a sua superexpressão esteja envolvida com a maior sobrevivência das células-mães.

Quanto a *SIR2*, o qual se observa ligeira redução, este comportamento pode ser atribuído ao fato desse gene está mais relacionado a extensão do RLS por evitar encurtamento dos telômeros e o acúmulo de círculos de rDNA extracromossômico, fenômenos estes associados ao envelhecimento, mas que costumam ocorrer devido ao processo de divisão celular. Durante a HHP a célula para o ciclo de divisão, assim, não haveria razões para *SIR2* produzir sirtuínas afim de evitar esse tipo de dano. Isso sugere que *SIR2* seja mais requerido para os efeitos benéficos da restrição calórica, quando a célula encontra-se na fase G0 do seu ciclo (WIERMANAND & SMITH, 2014).

Um gene muito citado na literatura por estar envolvido com envelhecimento é o *SCH9*. Este gene também é responsável pela expressão de proteínas quinases dependente de cAMP, com homólogo S6K1 em mamíferos (SILVA *et al.*, 2009). Por controlar esses mecanismos, *SCH9* também é considerado um dos reguladores-chave para longevidade e envelhecimento em leveduras.

SCH9 é um dos substratos de *TOR1* e detecta sinais de alterações de estresse emitidos por ele. Regula vários aspectos do metabolismo por afetar o crescimento e a longevidade. Por outro lado, a eliminação de *SCH9* aumenta a respiração das mitocôndrias durante o crescimento promovendo a geração de superóxidos. Também regula os níveis de proteínas ubiquitinadas (proteínas

com defeitos de conformação e que devem ser removidas), onde a sua deleção mostrou reduzir a quantidade dessas proteínas, mostrando ter um papel importante no controle da longevidade (QIE *et al.*, 2015).

Observamos na Figura 7, que a expressão de *SCH9* é pelo menos duas vezes maior em células-mães do que nas filhas antes da HHP. Após o estresse (Figura 8), nota-se que não houve variação significativa desse gene nem para células-mães e nem para as filhas. Sendo assim, *SCH9* parece não responder ao estresse por HHP. Sua expressão sofre alterações por outros estímulos estressores, como em resposta aos nutrientes, ao estresse por temperatura e ao envelhecimento cronológico (SWINNEN *et al.*, 2014), mas não pela HHP. Podemos dizer também, que como sinalizador de *TOR1*, *SCH9* não exerceu influência para suprimir *TOR1* nesse tratamento.

A via de sinalização *RAS* tem reportado um importante papel no controle do crescimento celular, metabolismo e resposta ao estresse. Também afeta a morfogênese e o desenvolvimento, incluindo a formação de pseudohifas, crescimento invasivo e proliferação celular desordenada quando superexpresso (BROGGI *et al.*, 2013).

RAS é uma via ativada quando exposta a fontes favoráveis de carbono (BROACH *et al.*, 1990; THEVELEIN, 1994). Em leveduras, *RAS* produz GTPases que sinalizam para a produção de PKA ou proteína quinase e cAMP. Condições contrárias, como a escassez de nutrientes e estresse oxidativo, são concomitantes com a repressão de *RAS/cAMP* (BROACH, 1991; PETKOVA *et al.*, 2010).

Proteínas quinases dependente de cAMP são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo de ATP. A fosforilação desses resíduos provoca estímulos intra e extracelulares que controlam a atividade de proteínas (SILVA *et al.*, 2009). Ruiz *et al.* (2010), sugere que *RAS2/cAMP* aumente a atividade mitocondrial, o que leva ao aumento da produção de ROS (Figura 9).

Podemos ver que antes da HHP, *RAS2* apresentava uma RQ pelo menos 3 vezes maior nas células mais velhas do que nas jovens. Após o tratamento de

pressão, a RQ de *RAS2* praticamente dobrou nas células jovens e teve uma ligeira redução nas mais velhas. Esse resultado trouxe benefícios para as células-mães, tendo em vista que o aumento de *RAS2* induz crescimento e proliferação desordenados, sendo interessante que seja reprimido. O aumento de sua expressão nas células-filhas pode ser um dos fatores que as levaram a morrer em proporções bem maiores.

Como podemos observar na Figura 9, o aumento da expressão de *RAS2/cAMP* induziria maior atividade das mitocôndrias, resultando em maiores quantidades de resíduos de ROS. Por haver mais ROS, os genes *SOD* e *CTT* seriam estimulados a aumentar para tentar livrar a célula desses agentes nocivos. Podemos perceber que esta teoria corrobora com os resultados de expressão gênica das células-filhas após o estresse (Figura 8).

Em contrapartida, nas células-mães ocorreria o oposto. Como *RAS/cAMP* não sofreu alteração significativa, as mitocôndrias não teriam sido estimuladas pelo cAMP e, por essa razão, não produziram tantas ROS, não sendo necessário superexpressar *SOD2* e *CTT1*. A sugestão de Ruiz *et al.* (2010) também vai de encontro com os resultados de expressão das células-mães nesse trabalho e, provavelmente, está relacionado a mecanismos de adaptação ao estresse.

Um dos fatores que provavelmente levaram a superexpressão de *RAS2* nas células-filhas, provavelmente foi a sinalização de *TOR* (será melhor detalhado a seguir). Pois, *TOR* é considerado um gene regulador (EVANS *et al.*, 2011), onde uma das suas funções é emitir sinais para a ativação de *RAS*, e *RAS* está associado com o fator de transcrição cAMP. Assim, podemos de fato observar que, tanto *TOR1* quanto *RAS2* foram superexpressados nas células jovens (Figura 8) após a HHP.

Já nas células-mães, como *TOR* foi muito reduzido, conseqüentemente, não emitiu sinais para alterar a expressão *RAS/cAMP*. Tudo leva a crer que o aumento da expressão de todos os genes (exceto *SCH9* que não respondeu ao estresse por HHP), se deu por indução direta e/ou indireta de *TOR*, que parece provocar uma cascata de ativações e supressões em genes de reparos de danos e resposta ao estresse.

Estudos mostram que *RAS2* e *TOR1* sinalizam vias integradas para regular crescimento e divisão celular sob variações de condições ambientais e nutricionais, onde cepas deletadas em *RAS2* mostraram aumento da resistência e da sobrevivência. Tem sido demonstrado que a redução da sinalização de *TOR1*, também promove longevidade tanto RLC quanto no RLS. Há relatos também de que o prolongamento da vida útil associada a deficiências de *RAS2* é parcialmente mediada pelo aumento da proteção celular contra o estresse oxidativo através da ativação de *SOD2* (LONGO *et al.*, 2008).

De fato, os resultados desse trabalho também corroboram com os de Longo *et al.* (2008), o qual mostrou que a diminuição da expressão de *RAS2* e *TOR1* contribuem para o aumento da sobrevivência. E também vai de encontro aos resultados de Mota (2015), que observou que a HHP com pré-tratamento subletal aumenta a produção de ROS e também de *CTT1* e *SOD2*. Porém, isso acontece considerando uma análise que envolve a população geral de um inóculo. O detalhe é que, quando se separou células jovens das mais velhas, observou-se que esse aumento de *SOD2* e *CTT1* está atribuído às células jovens, que no final das contas, sobreviveram bem menos.

TOR1 é um modulador celular capaz de integrar e equilibrar uma infinidade de sinais do ambiente intra e extra-celular para estimular ou inibir processos como regulação de tradução, autofagocitose, apoptose, fosforilação oxidativa mitocondrial e resistência ao estresse (EVANS *et al.*, 2011). A inibição dos sinalizadores de *mTOR* (moduladores de TOR) pode estender o tempo de vida de vários organismos apesar do mecanismo exato desses efeitos permanecerem desconhecidos (FINKEL, 2015).

Observamos que *TOR1* apresentava uma RQ pelo menos 5 vezes mais elevada nas células mães do que nas filhas antes do estresse, o que era perfeitamente esperado, pois sabe-se que este gene tem relação com o envelhecimento e tende a estar mais expresso em células mais velhas. Esperava-se que a HHP fosse capaz de reprimir essa expressão, e isso ocorreu nas células mais velhas. Porém, o que surpreendeu foi o fato das células jovens terem duplicado a expressão desse gene após o estresse.

Como já foi relatado anteriormente, *TOR1* induz envelhecimento e apoptose. E os resultados de sobrevivência das leveduras mostraram que células-filhas resistiram em torno de 25%, enquanto que as células-mães mostraram sobrevivência em torno de 60% (Figura 6). Esses resultados vão de encontro ao comportamento de *TOR1*, que se tornou elevado nas células jovens, que conseqüentemente morreram muito mais, e suprimido nas células mais velhas que tiveram “apoptose adiada”, sobrevivendo mais.

Parece que células muito jovens possuem mecanismos de respostas ao estresse oxidativo bastante rápido, como vimos com os aumentos de *CTT1* e *SOD2*. O fato das células jovens morrerem mais, não pareceu está relacionado com deficiência dos mecanismos de defesa dos antioxidantes. Também não podemos dizer que os mecanismos de reparo como *SGS1* e *SIR2* falharam nessa população, pois o fato de serem muito jovens e ainda não terem danos acumulados ao longo do tempo como ocorre com as células mais velhas pode justificar o não estímulo desses dois genes na população jovem. Ao que parece, as células-filhas sobreviveram menos por terem sido levadas a apoptose através da superexpressão de *TOR1*.

Assim como *TOR* sinaliza para *RAS*, podemos pensar que também possa acontecer um tipo de feed-back entre esses dois genes. Pois, ao passo que *TOR1* foi superexpresso e induziu a superexpressão de *RAS2*, esse gene induz crescimento invasivo/desordenado, logo, *TOR1* pode ter levado as células-filhas a morrerem por capitar sinais de descontrole no processo de divisão celular (emitidos por *RAS2*), apesar da divisão celular não está acontecendo nesse momento.

Resumindo todos os dados, percebemos que ter longevidade ou mais idade favorece uma resposta mais eficaz ao estresse. O estímulo estressor, pelo menos nas condições aplicadas nesse trabalho, parece ter sido bastante letal tanto para populações muito jovens quanto para as muito velhas, pois não podemos esquecer que cerca de quase 40% de células-mães também morreram, e provavelmente as células de idade mais extrema devem integrar a maioria das mortes dessa população. Talvez, uma outra metodologia deva ser aplicada a essa população jovem para se obter resultados tão favoráveis quanto

foi para as células de “meia idade”. Ou, talvez, o estresse não seja necessário ou útil em idades extremas.

Outra possibilidade observada é de que a resposta adaptativa ao estresse, a longevidade e o envelhecimento parecem estar surpreendentemente envolvidos com a atividade mitocondrial. A capacidade de manter a atividade mitocondrial em níveis constantes sob condições de estresse parece ser um importante fator de adaptação. Assim como um sedentário não resistiria a uma corrida de maratona por não ter capacidade respiratória preparada para tamanho estresse, as células-filhas, por serem muito jovens e inexperientes também não resistiram, em sua maioria, a esse estresse ao qual foram submetidas.

O estresse em um momento inadequado da vida parece provocar respostas súbitas capazes de afetar até as vias reguladoras do envelhecimento, mesmo que não dê tempo de se exibir fenótipos de envelhecimento precoce. Mas, se aplicado em momento e intensidade adequados parece promover longevidade. Podemos sugerir isso, através da maior sobrevivência observada em células pré-tratadas com estresse brando antes do estresse severo.

Apesar de não ter sido acompanhado o RLS e CLS das células sobreviventes para garantir que de fato o tempo de vida delas foi estendido, podemos criar positivas expectativas de que isso possa ter ocorrido. Pois, baseado na sobrevivência citada acima e em inúmeras referências mencionadas na literatura, a superexpressão do gene *SGS1* tem sido referido como capaz de aumentar significativamente o tempo de vida de leveduras por prevenir o acúmulo de círculos rDNA extracromossômico (OSIEWACZ, 2013). Assim, como a repressão de *RAS* e *TOR*, também tem mostrado esse efeito em outras citações.

Porém, permanece desconhecido os mecanismos exatos que levaram células tão jovens a superexpressarem genes como *TOR* e *RAS* que costumam ser mais expressos em células bem mais velhas ou com mutações genéticas. Esse resultado abre caminho para novas pesquisas sobre resposta adaptativa ao estresse, longevidade e envelhecimento.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com esse trabalho que células selvagens e mutantes responderam de forma muito parecidas aos tratamentos aplicados. Dessa forma, a mutação da cepa UCC5181 mostrou não afetar a sua capacidade de responder ao estresse por HHP. Ao analisar células-mães e filhas separadamente, notamos enormes diferenças desde suas taxas de sobrevivência até os resultados de expressão gênica. Esses resultados trazem novas perguntas que abre um leque para novos estudos. Saber que, mesmo pertencendo a uma mesma linhagem, os indivíduos manifestam respostas diferentes, já é intrigante. Descobrir que a idade também exerce importante influência sobre mecanismos de respostas adaptativas é ainda mais desafiador.

No que tange a utilização da HHP, pode-se observar que essa ferramenta biotecnológica pode ser capaz de induzir longevidade e retardar o envelhecimento em leveduras. Os mecanismos de resposta ao estresse e reparo de danos favorecido por um pré-tratamento subletal antes de um estresse severo, mostrou a possibilidade da HHP está sendo capaz de provocar uma extensão da longevidade das células. Isso pode ser observado através do resultado de aumento das taxas de sobrevivência, principalmente das células-mães.

Apesar dos resultados terem mostrado maiores benefícios às células mais velhas, não podemos deixar de lado que cerca de 25% das células-filhas também conseguiram resistir ao tratamento, e essa resistência pode estar associada a condições genéticas, que como traz a literatura, também exerce importante influência nesses mecanismos de resistência. Ainda há muito a ser explorado para compreender os mecanismos de respostas adaptativas ao estresse e sua relação com a longevidade, o envelhecimento e até mesmo a morte celular prematura. Entender essas respostas adaptativas pode ser a chave para conseguir estender a longevidade de forma saudável, além de poder contribuir para os avanços científicos contra as doenças do envelhecimento.

Podemos concluir com esse trabalho que, assim como o estresse pareceu contribuir com a longevidade celular, a longevidade também mostrou ser

importante por oferecer mecanismos de respostas adaptativas mais eficazes contra os estímulos estressores, pois foram as células mais velhas que produziram os melhores resultados. Como *S. cerevisiae* é um modelo eucarionte com mecanismos de resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento bastante conservados entre os eucariontes, o seu estudo pode conduzir a compreensão do momento ideal da vida para utilizar o estresse como uma ferramenta útil para estimular uma longevidade mais extensa e saudável em eucariontes superiores, inclusive humanos.

6. REFERÊNCIAS

- ARAMBURU, José *et al.* Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n.10, 2012.
- BARREIROS, André L. B. S; DAVID, Jorge M; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113123, 2006.
- BERMINGHAM, McDonogh O. *et al.* The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, n. 13, p. 4789-93, 1988.
- BERNSTEIN, K.A; GANGLOFF, S; ROTHSTEIN, R. The RecQ DNA helicases in DNA repair. **Annu. Rev. Genet.**, v. 44, p. 393-417, 2010.
- BERRY, David B. *et al.* Multiple Means to the Same End: The Genetic Basis of Acquired Stress Resistance in Yeast. **Plos Genetic**, v. 5, n. 11, November 2011.
- BITTERMAN, Kevin J. *et al.* Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, Genome Stability, and Heterochromatin, **Microbiology and molecular reviews**, p. 376-399, Sept. 2003.
- BRAVIM, Fernanda. *et al.* High hydrostatic pressure and the cell membrane: stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1189, p. 1-5, 2010.
- BRAVIM, Fernanda. **Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse de alta pressão hidrostática**. 156f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2011.
- BRAVIM, Fernanda *et al.* High hydrostatic pressure activates transcription factors involved in *Saccharomyces cerevisiae* stress tolerance. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 2712-2720, 2012.
- BRAVIM, *et al.* High hydrostatic activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093-2107, 2013.
- BREITENBACH, Michael.*et al.* Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. **FEMS yeast res.**, v. 14, n. 1, p. 198-212, february 2014.

- BROACH, J. R. & Deschenes, R. J. The function of RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Cancer Research**, v. 54, p. 79–139, 1990.
- BROACH, J. R. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. **Trends in Genetics**, v. 7, n. 1, p. 28–33, January 1991.
- BROGGI, S; MARTEGANI, E; COLOMBO, S. Nuclear Ras2-GTP Controls Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.
- BURHANS, W.C.; WEINBERGER, M. DNA replication stress, genome instability and aging. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 22, p. 7545-56, 2007.
- CAMERONI, E.; STETTLER, K.; SUTER, B. On the traces of XDP: cell cycle matteruntangling the genotype-phenotype relationship of XDP mutations, **Cell div.**, v.5, 2010.
- DANIEL, I. *et al.* Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. **Chemical Society Review**, Reino Unido, v. 35, n. 10, p. 858-875, 2006.
- DEFOSSEZ, Pierre A.; GUARENTE, Leonard; LIN, Su. Requirement of NAD and *SIR2* for Life Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sciencemag**, v. 289, September, 2000.
- DICKSON, Robert C.; HUANG, Xinhe. Down-Regulating Sphingolipid Synthesis Increases Yeast Lifespan. **PLoS Genet.**, v. 8, n. 2, february 2012.
- DOMITROVIC, Tatiana. *et al.* Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. **FEMS Yeast Research**, Holanda, v. 3, p. 341-346, 2003.
- DOMITROVIC, Tatiana *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 580, p. 6033–6038, 2006.
- EVANS, Daniel *et al.* TOR signalis never gets old: aging, longevity and TORC1 activity. **Ageing research reviews**, p.225-237, 2011.
- FABRIZIOP; LONGOV.D.The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Aging Cell**, v. 2, n.2, p. 73-81, 2003.
- FERNANDES, Patricia Machado Bueno, *et al.* Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**, Holanda, v. 556, p. 153-160, 2004.

FERNANDES, Patricia Bueno. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1239-1245, 2005.

FELDMANN, Hosty. **Yeast: Molecular and cell biology**. Ed: Willey blackweel, 2 ed, 464 p, 2012.

FINDEL, Toren. The metabolic regulation of aging. **Nature medicine**, v.21, n. 12, december, 2015.

FONTANA, Luigi; PARTRIDGE, Linda; LONGO, Valter. Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p.321-326, april, 2010.

FREITAS, Jéssica Martins. **Papel da fluidez da membrana plasmática na resistência à pressão hidrostática em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

GASH *et al.* Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 4241–4257, December, 2000.

GIANNATTASIO, S. *et al.* (2005) Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. **Gene**, v. 354, p. 93-98, 2005.

HARTMANN, Christoph; MATHMANN, Katrin; DELGADO, Antônio. Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 1-12, 2006.

HARTWELL, L.H; UNGER, M.W. Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. **J. Cell Biol.**, v. 75, p. 422–435, 1977.

HASTY *et al.* Aging and Genome Maintenance: Lessons from the Mouse? **Science**, v. 299, p.28 february, 2003.

HO, YI-HSUAN; GASH, Audrey P. Exploiting the yeast stress-activated signaling network to inform on stress biology and disease signaling. **Curr. Genet.**, v. 61, p. 503-511, 2015.

HOHMANN, Stefan; MAGER, Willem H. (Eds). **Yeast stress response**. Springer Verlag, Berlin, 389 p., 2003.

KAEBERLEIN, Matt *et al.* Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. **Mech. Aging Dev.**, v.126, p.491-504, 2005a.

KAEBERLEIN, Matt. Lessons on longevity from budding yeast. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 513-519, mar 2010.

KAEBERLEIN, Matt; RABINOVITCH, Peter S.; MARTIN, George M. Healthy aging: The ultimate preventative medicine. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1191-1193, december 2015.

KREGER-VAN, Rij. **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier: 2 ed, v. 1, p. 5-61, 1987.

LINDSTROM, Derek L.; GOTTSCHLING, Daniel E. The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.183, p.413-422, October, 2009.

LIPPUNER, A.D.; JULOU, T.; BARRAL, Y. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 38, p. 300–325, 2014.

LONGO, V.D. *et al.* Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 21, p. 12275-80, 1996.

LONGO, Li *et al.* Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. **PLoS Genet**, v. 4, n. 1, p. 13, 2008.

LUSHCHAK, V.I.; GOSPODARYOV, D.V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biol. Int.**, v. 29, n. 3, p. 187-192, 2005.

MELZER, David; HUST, Alison; FRAYLING, Tim. Genetic Variation and Human Aging: Progress and Prospects. **Journal of Gerontology: medical sciences**, v. 62a, n. 3, p. 301307, 2007.

MILISAV, Irina; POLJSKAK, Borut; SUPUT, Dušan. Adaptive Response, Evidence of Cross Resistance and Its Potential Clinical Use. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, n. 9, 2012.

MOTA, Mainã M. **Estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae* como efeito da alta pressão hidrostática**. 70f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2015.

NIKOLETOPOULOU, Vassiliki *et al.* Cellular and molecular longevity pathways: the old and the new. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, p. 212-223, April 2014.

- NIKOS, Kourtis; NEKTARIOS, Tavernakis. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. **The EMBO Journal**, v. 30, p.2520–2531, 2011.
- OCAMPO, Alejandro; BELMONTE, Juan Carlos Izpisu. Holding your breath for longevity. **Science**, v. 347, p. 1319, 2015.
- OGER, P.M; JEBBAR, M. The many ways of coping with pressure. **Rev. Bras. Microbiol.**v.161, n. 10, p. 799-809, december 2010.
- OSIEWACZ, Heinz. Biology of aging and its modulation: **Aging of Organisms**. Series editor: Suresh I.S Rattan, 2013.
- PALHANO, Fernando L. *et al.* Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 447-457, 2004.
- PALHANO, Fernando L. **Influência da pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*: correlação com estresses químicos e físicos**. 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.
- PALHANO, Fernando L. *et al.* Changes In Transcription and Protein Profile Induced By Hydrostatic Pressure Treatment In Microorganisms in Micro-organisms. **Current Proteomics**, v. 5, p. 138-145, 2008.
- PARTRIDGE, Linda *et al.* The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. **Cell**, v. 162, p. 72–83, July 2, 2015.
- PETKOVA, M.I. *et al.* Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19521-19531, june 2010a.
- QIE, B. *et al.* Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. **Redox Biol**, v. 5, p. 290-300, 2015.
- RATTANAWONG, Kasidit; KERDSOMBOON, Kittikhun; AUESUKAREE, Choowong. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione are involved in response to oxidative stress induced by protein denaturing effect of alachlor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Elsevier: Free radical biology and medicine**, v. 89, p. 963-971, December 2015.
- RIBEIRO, Sonia M.R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci.J.**, Uberlândia, v. 1, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIDDHIMAN, Dhar, *et al.* Yeast Adapts to a Changing Stressful Environment by Evolving Cross-Protection and Anticipatory Gene Regulation. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 3, p. 573–588, November 2012.

RINGVOLL, Jeanette. *et al.* Mutations in the *RAD27* and *SGS1* genes differentially affect the chronological and replicative lifespan of yeast cells growing on glucose and glycerol. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 848–859, 2007.

RUIZ, Maria A. T; PETKOVA, Mima I; CARRION, Pujol. Signalling Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 25, p. 19521-31, June 2010.

SARAIVA, Jorge A. *et al.* Microorganisms under high pressure — Adaptation, growth and biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1426–1434, 2013.

SILVA, Bárbara V. *et al.* Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. **Quím. Nova**, v.32, n.2, São Paulo, 2009.

SMITH, J.; WRIGHT, J.; SCHNEIDER, B.L. A budding yeast's perspective on aging: the shape I'm in. **Exp. Biol. Med.**, v. 240, n. 6, p. 701-710, Mar. 2015.

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

KOURTIS, Nikos; TAVERNARAKIS, Nektarios. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. **The EMBO Journal**, v.30, p. 2520–2531, 2011.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n.13, p. 1753–1790, December, 1994.

VÁCHOVÁ, *et al.* Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation and longevity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

VASSILIKI, Nikolettou; EMMANOUIL, Kyriakakis; NEKTARIOS, Tavernarakis. Cellular and molecular longevity pathways: the old and the new. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 24, April 2014.

VINOJ, T. George; BROOKS, Gavin and HUMPHREY, Timothy. Regulation of Cell Cycle and Stress Responses to Hydrostatic Pressure in Fission Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 4168–4179, October 2007.

WIERMAN, Margaret B., SMITH, Jeffrey S. Yeast Sirtuins and the Regulation of Aging.

FEMS yeast research, v. 14, n.1, p. 73-88, 2014.