UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA (PPGBq)

Diego Seixas Gomes de Almeida

Investigação do papel da via de sinalização retrógrada (RTG) de *Saccharomyces cerevisiae* na reprogramação metabólica celular e sua analogia com transformações tumorais de células humanas

RIO DE JANEIRO / RJ - BRASIL
2017

Diego Seixas Gomes de Almeida

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO RETRÓGRADA (RTG) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA CELULAR E SUA ANALOGIA COM TRANSFORMAÇÕES TUMORAIS DE CÉLULAS HUMANAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Rio de Janeiro
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

A447i

Almeida, Diego Seixas Gomes de

Investigação do papel da via de sinalização retrógrada (RTG) de *Saccharomyces cerevisiae* na reprogramação metabólica celular e sua analogia com transformações tumorais de células humanas / Diego Seixas Gomes de Almeida. - - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2017

112 f.: il

Orientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2017

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Metabolismo. 3. Mitocôndria. 4. Rtg2p. 5. Câncer. I. Eleutherio, Elis Cristina Araújo (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Investigação do papel da via de sinalização retrógrada (RTG) de *Saccharomyces cerevisiae* na reprogramação metabólica celular e sua analogia com transformações tumorais de células humanas.

Diego Seixas Gomes de Almeida

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO RETRÓGRADA (RTG) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA CELULAR E SUA ANALOGIA COM TRANSFORMAÇÕES TUMORAIS DE CÉLULAS HUMANAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 14 / 08 / 2017

Elis Cristina Araújo Eleutherio (D. Sc.) - Orientadora
IQ/UFRJ

Luciana Pizzatti Barbosa (D. Sc.)
IQ/UFRJ

Denise Pires de Carvalho (Ph. D.)
IBCCF/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cesar e Márcia, pelo amor e carinho essenciais em minha vida e por serem meus maiores exemplos de amor. Sempre minha maior fonte de inspiração e motivação, meus maiores críticos e, ao mesmo tempo, meus maiores apoiadores. Minha gratidão à minha mãe, por me ensinar que não é possível ser pleno como indivíduo sem amor e entrega ao próximo; e ao meu pai, por me ensinar que a vida só pode ser plena de significado e sentido quando respeitamos nossos valores. Ao meu irmão Bruno, fonte constante de amizade e companheirismo, o maior tesouro da minha vida, por me ensinar constantemente o valor e significado da palavra “disciplina”. Aos meus avós, Janete e Afonso, Generosa (em memória) e José, por sempre me incentivarem, em sua humildade, simplicidade e carinho na escolha dos meus caminhos e na tomada de minhas decisões.

Ao meu parceiro de vida, Pietro Mautoni, por me mostrar os caminhos inesperados pelo qual a vida pode nos levar. Agradeço pela palavra acertada que mitigava a dúvida, pelos conselhos de paz nos momentos de ansiedade, pelo apoio sólido nos momentos de incerteza, por me mostrar novos horizontes, por me fazer enxergar que existem desafios prazerosos e por me mostrar que há um futuro maravilhoso pela frente. Enfim, por não permitir que o essencial dentro de mim se perdesse durante essa etapa. A maior perda da vida não é a morte, mas sim o que morre dentro de nós enquanto vivemos. Obrigado por me manter vivo.

Ao amigo e mestre Ray Pereira, por todo apoio, pelos conselhos e diálogos longos e produtivos, pelas dúvidas incitadoras e por quebrar constantemente minhas certezas. Enfim, por me mostrar o caminho do meio.

A minha orientadora Elis Cristina Araújo Eleutherio pelos conselhos e discussões valiosas e essenciais para o desenvolvimento do meu projeto e para meu amadurecimento como pesquisador. Por me conceder a liberdade criativa de conduzir um projeto de pesquisa que me motivasse. Por me mostrar que a ciência se constrói passo a passo, e que as verdades e as respostas que buscamos são condicionadas ao tempo e ao nosso trabalho e esforço. Por me mostrar que o erro não é uma riqueza porque vira acerto, o erro em si mesmo é a riqueza. Erro é abertura. Erro é aprendizado.

Aos meus amigos, colegas e companheiros de bancada do Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse (LIFE) por todo o apoio, ajuda e por

compartilharem sua experiência e conhecimento. Acima disto, agradeço por dividirem suas histórias, suas vidas, sendo exemplos para minha própria vida e para minha conduta por diversas vezes. Agradeço por tornarem os dias menos cansativos e as horas mais prazerosas. Agradeço a Germana pelos inúmeros abraços desestressantes, a Rayne pela dose diária de drama, ao Daniel pela brisagem, ao Igor por agregar novos termos ao meu vocabulário, ao Mauro por fazer voltar o relógio pra dentro da bolsa, a Raquel por organizar os churrascos, a Mariana pelo humor ácido, a Aline pelo exemplo de leveza para a vida, a Natalia pelas risadas contagiantes, a Renata pelos diálogos impróprios para menores, a Gabrielle pelas aulas de dança em festas, a Karina pelos diálogos profundos na bancada, a Fernanda pela orientação constante, e a Nayanna por me instigar com perguntas e dúvidas.

Ao meu grande amigo Vinícius Simas Grilo por me dar os bons conselhos que apenas um bom amigo e irmão podem dar e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Agradeço também a minha amiga Letícia Rodrigues pelas discussões sobre projetos, sonhos e ideias, pelo apoio, torcida e amizade sempre presentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a todos os professores e mestres que passaram pela minha vida, fornecendo conhecimento e inspiração para que me dedicasse com afinco e paixão à área da Bioquímica. Durante minha jornada até aqui, tive mestres que me ensinaram que conhecimento sem propósito não vale de nada. Sou muito grato por ter desenvolvido este projeto de pesquisa, com a colaboração de tantas pessoas maravilhosas, sabendo que pude contribuir com mais uma pequena peça de um grande e complexo quebra-cabeça. Somente conhecimento compartilhado é capaz de edificar pessoas melhores que, por sua vez, constroem um mundo melhor a cada dia. Quando nos dedicamos com afinco ao que amamos, com humildade e sinceridade, respeitando os nossos valores e agregando propósito ao nosso trabalho, somos capazes de semear e colher bons frutos.

Espero que o conhecimento aqui edificado forneça esperança a tantas pessoas que sofrem direta ou indiretamente com a doença do câncer. A beleza da ciência é justamente essa: ela nos fornece voz para fazermos as perguntas que quisermos. Mas apenas o indivíduo em seus valores é capaz de lidar com as respostas daquilo que encontra nesse eterno processo de curiosidade. Fazer ciência

é dialogar com o mundo. Mas é um diálogo limitado, pois apesar de sempre questionar, a ciência nunca tem a resposta para todos os mistérios. Então o que a ciência nos ensina de mais fundamental? Que mesmo diante desse suposto impasse, mesmo sabendo que a verdade nunca pode ser alcançada, a ciência nunca para de perguntar. Essa é a maior lição: NUNCA parar de perguntar. Questionar é o único caminho. Questionar o mundo e a si mesmo. A todo o momento. A certeza é estática, apenas a dúvida é dinâmica. E é justamente a dúvida que move a roda do mundo.

Por fim, dedico este trabalho em memória a meu tio Robson Seixas Gomes, que faleceu de câncer e que não pode estar aqui para presenciar este projeto, mas que sempre esteve presente em meu coração e na minha memória durante seu desenvolvimento.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado em mais essa etapa da minha caminhada. Família, amigos, mestres... todos aqueles que me cercam.

Obrigado por derramarem tanto amor ao redor.

Diego Seixas Gomes de Almeida

Dedico este trabalho a você, leitor.

Que a jornada seja tão inspiradora para você quanto foi para mim.

Grandescunt Aucta Labore

(Pelo trabalho, todas as coisas crescem)

RESUMO

ALMEIDA, Diego Seixas Gomes. **Investigação do Papel da Via de Sinalização Retrógrada (RTG) de *Saccharomyces cerevisiae* na Reprogramação Metabólica Celular e sua Analogia com Transformação Tumorais de Células Humanas**. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo, foi investigado o papel desempenhado por Rtg2p, um ativador da via de sinalização retrógrada (RTG), sobre o perfil metabólico celular e a expressão de genes homólogos ou relacionados àqueles envolvidos na transformação tumoral de células humanas. Os resultados obtidos sugerem que Rtg2p desempenha um papel no balanço bioenergético celular, na regulação da quantidade e qualidade mitocondrial e na modulação da expressão de *ACO1*, *POR1*, *CRD1*, *RAS1*, *RAS2* e *SCH9*. Foi investigado o efeito de Rtg2p sobre a expressão de *RAS* e *SCH9*, relacionados aos oncogenes humanos RAS e AKT, respectivamente, frequentemente encontrados alterados ou mutados em células de câncer. Utilizando as cepas selvagem e *rtg2Δ*, investigou-se o efeito de Rtg2p sobre a remodelação do padrão de expressão gênica após progressiva adaptação celular à condição de disfunção mitocondrial, ocasionada pela inibição respiratória sustentada mantida por antimicina. O objetivo principal era induzir um resposta adaptativa celular à disfunção respiratória. Os dados obtidos indicam que Rtg2p e, portanto, a via RTG, é essencial para a modulação irreversível (aumento de expressão) dos genes *RAS1* e *RAS2* em *Saccharomyces cerevisiae* após adaptação à disfunção mitocondrial. O aumento da expressão de *SCH9* após adaptação à disfunção mitocondrial ocorre de modo independente de Rtg2p, e possivelmente envolve outras vias. De modo geral, este estudo sugere que a remodelação de expressão dos genes *RAS* e *SCH9* em levedura é um fenômeno à jusante da adaptação celular à disfunção mitocondrial. Tal observação levanta o questionamento se o mesmo ocorre durante a transformação celular que leva ao desenvolvimento do câncer. Neste caso, este estudo fornece evidências de que o câncer pode ser encarado como uma doença metabólica mitocondrial.

Palavras-chave: Rtg2p, Metabolismo, *Saccharomyces cerevisiae*, Câncer, Mitocôndria

ABSTRACT

ALMEIDA, Diego Seixas Gomes. **Investigação do Papel da Via de Sinalização Retrógrada (RTG) de *Saccharomyces cerevisiae* na Reprogramação Metabólica Celular e sua Analogia com Transformação Tumorais de Células Humanas**. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, we investigated the role of Rtg2p, an activator of the retrograde (RTG) pathway in yeast, over the metabolic profile of the cell and the expression of a set of genes that are homologous or correlated to those involved in tumoral transformation of the human cell. Together, our data suggest that Rtg2p plays a role in balancing the bioenergetic profile of the cell, regulating mitochondrial quantity and quality and modulating the expression of *ACO1*, *POR1*, *CRD1*, *RAS1*, *RAS2* and *SCH9*. We particularly focused on the role of the Rtg2p over the expression of *RAS* and *SCH9* genes, which are related to the human oncogenes RAS and AKT respectively, frequently found altered or mutated in tumours. Using a wild-type and *rtg2Δ* strain, we investigated the role of Rtg2p over cell gene expression after a progressive adaptation to mitochondrial dysfunction, caused by a sustained respiratory inhibition with antimycin. We aimed to induce an adaptive cell response to mitochondrial dysfunction in order to study the dynamics of cell transformation. We found that Rtg2p, thus the RTG pathway, is essential for the irreversible modulation (increased expression) of *RAS1* and *RAS2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* after adaptation to mitochondrial dysfunction. *SCH9* increased expression after adaptation to mitochondrial dysfunction was not dependent on Rtg2p, but rather an event that may involve multiple pathways. Overall, our data suggest that the remodelation of *RAS* and *SCH9* gene expression in yeast is a downstream phenomenon of cellular adaptation to mitochondrial dysfunction. This raises the question if the same may occur during human cell transformation that leads to cancer development. In such case, these data provide evidence that cancer can be viewed as a mitochondrial metabolic disease.

Keywords: Rtg2p, Metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*, Cancer, Mitochondria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo da Via de Sinalização Retrógrada (RTG) em *Saccharomyces cerevisiae*. Variações de diversos sinais provenientes da mitocôndria mediante dano à organela sinalizam a disfunção mitocondrial. Rtg2p atua como sensor transdutor deste sinal, ativando a via RTG e promovendo a expressão de genes associados à resposta metabólica retrógrada ($\Delta\Psi_m$: potencial da membrana mitocondrial, EROS: Espécies reativas de oxigênio, *PYC1*: piruvato carboxilase, *ACS1*: acetil-coenzima A sintetase, *CIT1*: citrato sintase, *CIT2*: citrato sintase peroxissomal, *ACO1*: aconitase, *IDH1/2*: isocitrato desidrogenase) (adaptado de Cunha, Torelli & Kowaltowski, 2015 [55]). 37

Figura 2. Resposta metabólica induzida pela via retrógrada (RTG) em *Saccharomyces cerevisiae* (X: interrupção ou disfunção do ciclo, *PYC1*: piruvato carboxilase, *ACS1*: acetil-coenzima A sintetase, *CIT1*: citrato sintase, *CIT2*: citrato sintase peroxissomal, *ACO1*: aconitase, *IDH1/2*: isocitrato desidrogenase) (adaptado de Jazwinski, 2013 [31]). 39

Figura 3. Disfunção respiratória mitocondrial como a origem do câncer. Na presença de um dano mitocondrial contínuo ou persistente, a modulação adaptativa celular ocorre de modo a ajustar progressivamente a célula à nova condição metabólica, e não mais a restabelecer de suas funções normais. Ocorre uma progressiva supressão das funções mitocondriais e inativação de vias dependentes da mitocôndria, ocasionando o fenótipo / genótipo tumoral. (adaptado de Seyfried et al, 2014 [9]).....43

Figura 4. Taxa de Consumo de Glicose das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo fermentativo, sob repressão catabólica (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. 68

Figura 5. Taxa de Consumo de Oxigênio das cepas WT, *rtg2Δ* e *rtg3Δ* em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. 69

Figura 6. Oxidação intracelular das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD). 70

Figura 7. Peroxidação Lipídica das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD). 71

Figura 8. Perfil de inibição respiratória das cepas WT e *rtg2Δ* na presença dos inibidores respiratórios (A) cianeto e (B) antimicina, em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.....73

Figura 9. Perfil de inibição respiratória comparativo entre as cepas WT, *rtg2Δ* e *rtg3Δ* na presença dos inibidores respiratórios cianeto e antimicina, em metabolismo respiratório (YPD). Os valores sobre as barras indicam a porcentagem de inibição da taxa de consumo de oxigênio após o tratamento com o respectivo inibidor respiratório. (*) resultados estatisticamente diferentes para p < 0,05.....74

Figura 10. Expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. 75

Figura 11. Atividade de aconitase das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para p < 0,05.....77

Figura 12. Porcentagem populacional de colônias respiratório-deficientes (petites) e respiratório-competentes (não-petites) das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD).....78

Figura 13. Taxa de Consumo de oxigênio das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório no meio YPD ou YPGly. (*) resultados estatisticamente diferentes para p < 0,05. 79

Figura 14. Porcentagem populacional das cepas WT e *rtg2Δ* ao longo do tempo durante o ensaio de competição em meio YPGly.....80

Figura 15. Porcentagem populacional de colônias respiratório-competentes (não-petites) e respiratório-deficientes (petites) durante o ensaio de competição realizado entre as cepas WT e *rtg2Δ*, durante crescimento em YPGly. 81

Figura 16. Expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. 88

Figura 17. Porcentagem populacional de colônias respiratório-deficientes (*petites*) e respiratório-competentes (não-*petites*) das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD) após (A) a primeira adaptação em antimicina (30 µM / 72 h) e (B) a terceira e última adaptação em antimicina (100 µM / 72 h).....92

Figura 18. Expressão gênica relativa WT* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina).....94

Figura 19. Expressão gênica relativa *rtg2Δ** / *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina). 96

Figura 20. Expressão gênica relativa WT* / *rtg2Δ** em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina). 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR. 64

Tabela 2. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. 76

Tabela 3. Genes de *Saccharomyces cerevisiae* selecionados para avaliação de expressão. Os genes foram relacionados a transformações associadas à alteração da dinâmica mitocondrial (ACO1, POR1, CRD1), remodelação bioenergética (HXK2) e desregulação de crescimento (RAS1, RAS2, SCH9). 87

Tabela 4. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. 89

Tabela 5. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa WT* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (* cepa adaptada em antimicina). 95

Tabela 6. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ** / *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (* cepa adaptada em antimicina). 96

Tabela 7. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa WT* / *rtg2Δ** em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (*cepa adaptada em antimicina). 98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial da membrana mitocondrial
ρ^0	Célula depletada no mtDNA
ρ^+	Célula com mtDNA presente
ρ^-	Célula com mutação no mtDNA
Abs	Absorbância
ACO1	Aconitase
ACS1	Acetil-coenzima A sintetase
AKT	Proteína quinase B
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATF	Fator de ativação transcricional
CAC	Ciclo do ácido cítrico
cAcn	Aconitase citoplasmática
cAMP	AMP cíclico
cDNA	DNA complementar
CIT1	Citrato sintase citoplasmática
CIT2	Citrato sintase peroxissomal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COI	Citocromo oxidase I
COX	Citocromo c oxidase
CRD1	Cardiolipina sintase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Cyt b	Citocromo b
DFC	2’,7’-diclorofluoresceína
$DFCH_2$	2’,7’-diclorodi-hidrofluoresceína
$DFCH_2$-DA	2’,7’-diclorodi-hidrofluoresceína diacetato
DHAP	Di-hidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acetato
EROs	Espécies reativas de oxigênio
f	Fator de peso seco

F	*Primer forward*
FH	Fumarato hidratase
FNS	Fosforilação a nível de substrato
FosfOx	Fosforilação Oxidativa
G6P	Glicose-6-fosfato
GLK	glicoquinase
GPx	Glutationa peroxidase
GTP	Trifosfato de guanosina
Gut	glicerol quinase
HAP	Heme activator protein
HK	Hexoquinase humana
HXK	Hexoquinase (*Saccharomyces cerevisiae*)
IDH	Isocitrato desidrogenase
mAcn	Aconitase mitocondrial
MDA	Malondialdeído
mtDNA	DNA mitocondrial
mTOR	*Mechanistic target of Rapamycin*
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAD^+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
ND	NADH desidrogenase
nDNA	DNA nuclear
NFAT	Fator nuclear de células-T ativadas
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OD	Densidade ótica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFK	Fosfofrutoquinase
PGM	Fosfoglicerato mutase
pH	Potencial de hidrogênio
PK	Piruvato quinase
POLG	Polimerase gama
POR1	Porina mitocondrial
PYC1	Piruvato carboxilase

R	*Primer reverse*
RAS	*Rat sarcoma virus*
RFU	*Relative fluorescence unit*
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RTG	Via retrógrada
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SDH	Succinato desidrogenase
SLIK	Complexo transcricional coativador SAGA-like
TBARS	*Thiobarbituric acid reactive substances*
TIGAR	*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*
tRNA	RNA transportador
VDAC	*Voltage dependent anion channel*
WT	*Wild type*
YPD	*Yeast extract - Peptone - Dextrose*
YPGly	*Yeast extract - Peptone - Glycerol*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
1.1. Câncer 21
1.2. O Paradoxo Oncogênico 22
1.3. Efeito Warburg e a Modulação Bioenergética do Câncer 26
1.4. A Mitocôndria e o Câncer 30
1.5. A Via de Sinalização Retrógrada 35
1.6. A Origem do Câncer: Uma Dinâmica Adaptativa 41
1.7. *Saccharomyces cerevisiae* como Modelo de Estudo para o Câncer 43
2. OBJETIVOS 49
3. MATERIAIS E MÉTODOS 53
3.1. Composição dos Meios de Cultivo 55
3.2. Cepas / Estoque 55
3.3. Condições de Cultivo / Crescimento 55
3.4. Curva de Crescimento 56
3.5. Consumo de Glicose em Condições Não-Proliferantes 56
3.6. Consumo de Oxigênio 57
3.7. Oxidação Intracelular 58
3.8. Peroxidação Lipídica 59
3.9. Avaliação de células respiratório-deficientes (*petites*) 60
3.10. Ensaio de Competição 60
3.11. Atividade Enzimática de Aconitase 61
3.12. Adaptação em Cianeto / Antimicina 62
3.13. Avaliação da Expressão Gênica 62
3.14. Análise de Dados e Análise Estatística 64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
4.1. Caracterização Metabólica 67
4.2. Transformação Metabólica 82
5. CONCLUSÕES 99
6. REFERÊNCIAS 103

I. INTRODUÇÃO

Sobre a vida:

“A vida é... um evento químico”

- Paul Ehrlich, 1870

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O Câncer é uma doença caracterizada por um conjunto de alterações nos status genético e metabólico celular que culminam numa desregulação de diversos processos celulares, incluindo crescimento, proliferação e metabolismo. Estas alterações no status celular fazem com que a célula adquira progressivamente um perfil proliferativo exacerbado e alguns atributos bioquímicos e biológicos característicos das doenças neoplásicas, tais como: manutenção de sinais proliferativos sustentáveis, insensibilidade a sinalizações inibidoras de crescimento, resistência à morte celular programada (apoptose) e capacidade replicativa exacerbada. Tais características induzem a angiogênese e favorecem os processos de invasão e metástase [1]. Outras características importantes envolvidas na patogênese da doença são: a capacidade de modificação ou reprogramação do metabolismo celular de modo a sustentar a demanda bioenergética e de bioprecurssores necessários à proliferação neoplásica, e a grande instabilidade genética, que facilita a manutenção de elevada mutagenicidade, permitindo a progressão tumoral e a geração de sublinhagens em um mesmo tumor, tornando-o resistente a tratamentos por radiação ou quimioterapia.

As células cancerígenas apresentam uma desregulação de diversos processos intracelulares, como expressão gênica, modulação bioenergética, sinalizações e respostas adaptativas que, além de alterar o perfil celular, fornecem certa vantagem competitiva no ambiente tecidual. De modo geral, tais células apresentam como características: (i) desvio metabólico para obtenção de energia (ATP) pela via fermentativa (fermentação aeróbica); (ii) produção de elevadas quantidades de ácido láctico (pH ácido); (iii) formação de estruturas de coagulação proteica ao redor das células tumorais que impedem a atuação imune adequada (diminuição da reatividade imune); (iv) replicação celular descontrolada; (v) perda da comunicação célula-célula (ruptura da arquitetura e comunicação tecidual local); (vi) potencial invasivo e migratório para outros tecidos exacerbado; (vii) disfunção mitocondrial [2].

As características do câncer dependem intimamente de alterações bioquímicas e celulares, que atuam em conjunto com a contribuição do

microambiente tumoral para o desenvolvimento da doença. A invasão tumoral em tecidos adjacentes e seu espalhamento (metástase) para órgãos distantes é a causa primária da morbidade e mortalidade dos pacientes.

Devido ao envelhecimento da população humana, o câncer se tornou a causa de morte natural mais comum no mundo (*World Cancer Report*, 2014). De acordo com a *World Health Organization* (WHO) o câncer se encontra entre as principais causas de morbidade e mortalidade mundiais. Em 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Segundo projeções, espera-se que o número de novos casos aumente em 70% nas próximas duas décadas.

1.2. O Paradoxo Oncogênico

A falta de uma teoria unificadora que explique a causa primária das alterações progressivas no status celular, que culminam com a geração do câncer, ainda é o principal empecilho para uma compreensão mais profunda da doença. A teoria mais difundida e aceita é a de que o câncer é uma doença de origem genética, ocasionada pelo acúmulo progressivo de mutações do DNA nuclear que afetam oncogenes e/ou genes supressores de tumor, alterando suas funções [3]. Estas mutações surgiriam aleatoriamente durante a replicação do DNA e durante a exposição a agentes mutagênicos [1]. Desta forma, o câncer seria considerado uma doença genética somática.

A elevada instabilidade genômica é uma característica comum em diversos tipos de tumores, havendo uma grande heterogeneidade genética entre as células de um mesmo tipo histopatológico de tumor, o que impacta diretamente a resposta terapêutica. Estudos revelaram que mutações em aproximadamente 140 genes podem promover tumorigênese. Um tumor típico apresenta de dois a oito destes genes promotores mutados. Tais genes podem ser classificados como pertencentes a 12 famílias de vias de sinalização, que regulam três principais processos celulares: divisão celular, sobrevivência celular e manutenção genômica [4]. Uma melhor compreensão destas vias é uma das maiores necessidades na área de pesquisa em câncer.

A noção de que danos mutacionais ao DNA genômico são a causa primária do câncer leva à conclusão de que o câncer deve ser encarado como um conjunto

complexo de doenças e não como uma única doença de etiologia específica, visto que cada tipo de câncer apresentaria mutações únicas que variariam de indivíduo para indivíduo e de um tipo celular para outro. A visão do câncer como uma doença genética somática impacta diretamente nos direcionamentos de verbas para pesquisas na área e para o desenvolvimento de futuros tratamentos [5]. Apesar da identificação de diversas mutações específicas em oncogenes e genes supressores de tumor, existem diversas inconsistências nas evidências experimentais do câncer como doença genética.

A aparente incoerência acerca da teoria somática do câncer foi evidenciada e descrita por Albert Szent-Györgyi, ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1937. Segundo ele: "*A transformação maligna de tecidos envolve um paradoxo que, ao meu conhecimento, não foi apontado antes. Esta transformação é um processo muito específico que deve envolver mudanças muito específicas em uma maquinaria química muito específica. Sendo assim, seria esperado que tal transformação fosse desencadeada apenas por um processo altamente específico, assim como cadeados só podem ser abertos por suas próprias chaves. Oposto a isso, uma transformação maligna pode ser ocasionada por um número infinito de influências não específicas, como amianto, radiação de alta energia, irritação, agentes químicos, vírus etc. Está cada vez mais difícil encontrar algo que não seja carcinogênico. O fato de que um processo altamente específico seja desencadeado de maneiras não específicas é totalmente inesperado*" [6].

Atualizando a referência, como se pode explicar que agentes tão inespecíficos, atualmente conhecidos causadores de câncer - agentes químicos, radiação de alta energia, vírus, processos inflamatórios, envelhecimento, espécies reativas de oxigênio - possam ocasionar mutações específicas dentro de um grande número de nucleotídeos disponíveis, num gene específico dentre de milhares de genes, em um tipo celular específico dentre tantos outros, de modo que culmine com uma resposta altamente específica no status celular? Szent-Györgyi prossegue e propõe uma interpretação para a questão: "*O paradoxo pode ser resolvido supondo que o processo em questão ocorra em duas etapas: uma inespecífica e outra específica. A ação inespecífica pode ser a de criar desordem. Desordem em sistemas ordenados pode ser produzida por praticamente qualquer influência*." Desta forma, a instabilidade genômica (processo específico) seria consequência de um processo danoso não-específico à célula, e não a causa mais fundamental para o

surgimento do câncer. Isto explicaria o fato de serem encontrados frequentemente diversos defeitos genômicos e mutações nas células de câncer, estando estas associadas ou não à carcinogênese.

Thomas N. Seyfried, em 2012, analisa criticamente diversos dados experimentais da literatura que sugerem que o câncer seria uma doença de causa genética. Segundo a análise, existe grande inconsistência nos dados que suportariam a teoria somática [7–9]. Enquanto que a instabilidade genômica é um fenótipo comum em diversos tipos de tumores, a evidência de que esta instabilidade seria a causa fundamental é marginal. Uma revisão critica dos dados disponíveis na área levanta a possibilidade de que a insuficiência respiratória pode preceder o desenvolvimento da instabilidade genômica. Diversos dados experimentais, especialmente relacionados a estudos com cíbridos, indicam que um núcleo tumoral é capaz de direcionar um desenvolvimento celular normal na presença de um citoplasma saudável, mas um núcleo saudável não é capaz de direcionar um desenvolvimento saudável quando em um citoplasma tumoral. Segundo tais evidências, a presença de um citoplasma saudável é fundamental para supressão de vias oncogênicas.

Seriam então as mutações frequentemente observadas em células tumorais, consequência da elevada instabilidade genômica, um fenômeno secundário do desenvolvimento tumoral?

Diversas inconsistências em relação à teoria somática do câncer já foram descritas na literatura, principalmente através de experimentos de transferência nuclear / citoplasmática (cíbridos) entre células saudáveis e cancerígenas. Evidências experimentais indicam que o núcleo da célula tumoral, que contém as mutações associadas ao câncer, não parece ser suficiente nem a causa mais fundamental para a ativação de vias oncogênicas e para a transformação tumoral.

McKinell e colaboradores, em 1969, transplantaram um núcleo de uma célula de um tumor renal de rã - que contém as mutações genéticas associadas ao tumor - para um zigoto ativo e anucleado saudável da mesma espécie. As blástulas gastruladas desenvolveram girinos ativos e saudáveis, com tecidos e órgãos funcionais e responsíveis a estímulos, com perfeita diferenciação de tecidos, ainda que contendo núcleos tumorais. No entanto, o desenvolvimento completo do animal foi abortado antes de alcançar a fase adulta [10]. Israel & Schaeffer, em 1987, prepararam cíbridos citoplasmáticos utilizando células epiteliais hepáticas saudáveis

e tumorigênicas de ratos, verificando que os clones cíbridos gerados, quando injetados em ratos recém-nascidos isogênicos da cultura celular inicial, geraram tumores em apenas 51% dos animais, comparados com 92% de animais injetados com as células tumorais parentais. Dentre os animais que sobreviveram e desenvolveram câncer, os injetados com os cíbridos sobreviveram por mais tempo do que aqueles injetados com o tumor parental, indicando que o citoplasma saudável é capaz de inibir o desenvolvimento maligno tumoral [11].

Em outro experimento, Shay e Werbin, em 1988, fizeram a fusão de carioplastos derivados de uma linhagem celular tumorigênica de murinos com citoplastos derivados de uma linhagem não-tumorigênica. Os clones sobreviventes após a seleção não apresentavam fenótipo tumorigênico, suportando as evidências de que a presença de fatores citoplasmáticos são capazes de inibir a tumorigenicidade [12]. Li e colaboradores, em 2003, demonstraram que blastocistos derivados de núcleos de meduloblastoma são capazes de gerar embriões com desenvolvimento correto dos folhetos embrionários (endoderma, mesoderma, ectoderma), anexos embrionários e diferenciação de tubo neural e vesículas cefálicas, sem o fenótipo de proliferação exacerbada característico deste tipo de tumor e das mutações presentes no núcleo, apesar de os embriões serem abortados em uma determinada etapa do desenvolvimento [13].

Mintz e Illmensee, em 1975, injetaram células tumorais malignas de teratocarcinoma em blastocistos de ratos para verificar a capacidade de desenvolvimento, constituição genética e reversibilidade de malignidade no animal gerado. Os tecidos gerados no animal final apresentaram função normal e codificaram corretamente seus produtos e as células de teratocarcinoma mantidas *in vivo* mantiveram a capacidade de desenvolvimento totipotente. Desta forma, a conversão à malignidade do câncer não envolveria unicamente eventos mutacionais, sendo possível reversão à normalidade [14]. Hochedlinger e colaboradores, em 2004, clonaram ratos a partir de células de diversos tipos de tumores (leucemia, linfoma e câncer de mama), o que permitiu o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Células-tronco embrionárias puderam ser obtidas a partir de um blastocisto clonado de um núcleo de melanoma, permitindo a diferenciação de múltiplos tipos celulares (incluindo melanócitos, linfócitos e fibroblastos), de modo que quimeras foram produzidas a partir destas células-tronco. A presença de anormalidades genéticas

no embrião clonado a partir do núcleo tumoral fornece evidências genômicas de que o animal desenvolvido foi gerado a partir de um núcleo tumoral [15].

Há diversas evidências experimentais de que a expressão e ação de vias oncogênicas, de modo geral, são suprimidas na presença de um citoplasma saudável, ainda que estejam presentes no DNA nuclear as mutações associadas ao câncer que estimulam tais processos. Os resultados dos experimentos citados indicam que as mutações nucleares presentes nas células tumorais parecem não ser a causa mais fundamental do desenvolvimento fenotípico tumoral e reafirmam, novamente, o papel do citoplasma na regulação e supressão de vias oncogênicas.

Mas qual seria o elemento responsável pela supressão do fenótipo tumoral, presente no citoplasma? O primeiro indício de qual seria este elemento provém de uma observação experimental evidenciada pelos trabalhos de Otto Warburg, em 1923, acerca da assinatura metabólica bioenergética das células cancerígenas.

1.3. Efeito Warburg e a Modulação Bioenergética do Câncer

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem dentro de uma célula ou de um organismo, responsável pela manutenção da sua homeostase. O entendimento de suas vias e regulações permite compreender as respostas celulares a diferentes condições. As primeiras diferenças a serem identificadas entre células saudáveis e cancerígenas foram de origem metabólica. Existem alterações dramáticas no modo como as células tumorais organizam seus processos catabólicos e anabólicos. A assinatura bioenergética de uma célula cancerígena é diferente da de uma célula saudável. Os primeiros trabalhos acerca do metabolismo energético do câncer foram conduzidos por Otto Warburg, em 1923.

Otto Warburg foi um pesquisador pioneiro em Bioquímica e um cientista verdadeiramente interdisciplinar, que fez contribuições substanciais para o entendimento do metabolismo de câncer. Warburg verificou que todas as células cancerígenas investigadas em suas pesquisas exibiam um efeito Pasteur (inibição da fermentação pela presença de O_2) reverso, ou seja, tais células produziam lactato a partir da glicose mesmo em condições de normóxia. A fermentação da glicose a lactato, mesmo em presença de oxigênio, passou a ser um fenômeno frequentemente observado em diversos tipos de tumores, sendo um fenótipo característico do câncer. Tal fenômeno passou a ser denominado efeito Warburg e

corresponde a um fenótipo frequentemente observado em células tumorais, apesar de suas causas e interpretações serem amplamente debatidas na literatura [16].

Segundo a hipótese de Warburg: "*A origem do câncer está no componente metabólico anaeróbico de células em crescimento normal, que é mais resistente a danos do que o componente respiratório. Danos ao organismo favorecem este componente anaeróbico e, portanto, produzem o câncer*" [16–18]. Warburg foi agraciado com o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1931, por suas descobertas da citocromo c oxidase, não pelo seu trabalho em câncer.

Segundo a interpretação dos experimentos de Warburg, o fenótipo cancerígeno seria uma consequência de uma perda progressiva da capacidade respiratória celular [18]. De modo a compensar a perda respiratória, a produção energética de ATP por fosforilação a nível de substrato (via fermentativa) gradualmente passaria a compensar pela produção de ATP via fosforilação oxidativa, produzindo lactato. O desvio metabólico para fermentação, inicialmente expresso como uma resposta transiente à disfunção respiratória, progressivamente passaria a exercer um papel predominante na regulação dos processos celulares, na presença do dano respiratório sustentado. Sendo assim, a célula não conseguiria retornar à condição respiratória e passaria a fermentar mesmo na presença de oxigênio (efeito Warburg).

A assinatura metabólica gerada pela manutenção do efeito Warburg representa uma característica que fornece diversas vantagens de sobrevivência à célula tumoral. A manutenção da elevada taxa glicolítica, mesmo em condições aeróbicas, permite à célula tumoral obter ATP de maneira rápida para manutenção dos processos celulares mesmo em condições adversas. Apesar de o rendimento de ATP por molécula de glicose ser bem mais baixo na fermentação que na respiração, a taxa metabólica durante a fermentação aeróbica nas células tumorais é maior, de forma que a produção de lactato a partir da glicose ocorre mais rápido do que a completa oxidação da glicose, permitindo a aobtenção de ATP de maneira mais rápida [19]. Desta forma, a intensa glicólise observada no efeito Warburg permite suprir rapidamente a elevada demanda energética de células tumorais em intensa proliferação, sendo uma vantagem competitiva. A obtenção de ATP pela via fermentativa também representa uma vantagem em ambientes de hipóxia ou no interior de tumores pouco vascularizados, onde o aporte de oxigênio e nutrientes é escasso [20].

O efeito Warburg também representa um mecanismo de adaptação para suprir as demandas de intermediários de biossíntese, necessários principalmente para a manutenção da intensa proliferação tumoral. Para isto, o intenso consumo de glicose é utilizado para fornecer esqueletos de carbono para diversos processos anabólicos, visto que diversas vias se ramificam a partir da via glicolítica, sendo necessárias à síntese de nucleotídeos, lipídeos e proteínas [21]. Células tumorais em intensa proliferação necessitam ainda de NADPH para realização de biossínteses redutoras. Desta forma, o aumento do consumo de glicose permite uma maior síntese de NADPH pela via das pentoses fosfato, uma das ramificações da via glicolítica. O NADPH é utilizado principalmente para síntese *de novo* de lipídeos [22].

A fermentação intensa no efeito Warburg diminui o pH do microambiente tumoral, devido a conversão do piruvato a ácido láctico, que é secretado pela célula. A acidose do meio beneficia a proliferação tumoral de múltiplas formas, principalmente pela difusão de H^+ a partir do microambiente tumoral para tecidos adjacentes, onde ocasiona remodelação tecidual e facilita a invasão local [23]. A manutenção da intensa glicólise ainda atua como sinal transdutor que afeta diversos processos celulares, especialmente através da modulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que mediam respostas celulares de proliferação, quando em concentrações adequadas. O efeito Warburg ocasiona alterações no potencial redox mitocondrial, modificando a geração de EROs. A disponibilidade de NADH para cadeia transportadora de elétrons (CTE) é um importante determinante do potencial redox mitocondrial, de modo que a alteração do fluxo glicolítico afeta diretamente a balanço de NADH. As lançadeiras de malato-aspartato são capazes de manter o balanço de NADH entre o citosol e a mitocôndria até certo ponto. No entanto, em elevada taxa glicolítica, a conversão do piruvato em lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH) passa a ser preponderante para o balanço de NADH, desviando o controle mitocondrial, contribuindo para alterações da geração de EROs e, consequentemente, de sinalizações dependentes destas [21,24]. Estudos demonstram ainda que existe uma relação entre metabolismo celular e modificações pós-traducionais em histonas, que controlam a expressão gênica [25,26], sendo demonstrado que o fluxo glicolítico influencia na remodelação da estrutura da cromatina, regulando diversas funções celulares, incluindo proliferação e crescimento [27].

A intensa glicólise tumoral pode ser explicada por alterações de expressão, atividade e regulação das enzimas que participam da via glicolítica. A este respeito, verificou-se que cada uma delas é superexpressa e/ou desregulada em diversas linhagens tumorais [17]. Uma vez que a contribuição para o fluxo metabólico global é diferente para cada enzima, a estimulação de etapas que controlam o fluxo glicolítico tem um impacto importante para o aumento quantitativo da glicólise. Hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato-quinase (PK) são pontos de controle da via e os seus padrões de expressão e regulação são alterados em alguns tumores. A hexoquinase 2 (HK2) é a principal isoforma superexpressa em alguns tumores [20] e tem sido relacionada à manutenção do efeito Warburg e da progressão tumoral [28].

Além disso, a desregulação do metabolismo oxidativo durante o efeito Warburg, ocasionado pela disfunção ou supressão da atividade mitocondrial (ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa), poderia auxiliar as células tumorais no escape do processo de apoptose dependente da mitocôndria [20], além de desregular processos de proliferação e diferenciação celular [29].

As observações de Warburg acerca do metabolismo tumoral foram complementados por diversos experimentos posteriores, corroborando a hipótese inicial de que um dano irreversível à capacidade respiratória celular exerce um efeito na modulação cancerígena [17]. Com o passar do tempo, a importância de oncogenes e supressores de tumor, bem como os processos de proliferação e apoptose foram sendo elucidados e, com isso, o papel do metabolismo no desenvolvimento do câncer foi progressivamente perdendo atenção da comunidade científica, devido à noção geral de que as alterações metabólicas observadas eram simplesmente uma consequência do processo de transformação maligna. No entanto, o aumento da compreensão dos mecanismos moleculares do metabolismo levou a um ressurgimento de interesse na área, junto com o crescente entendimento de que a transformação metabólica pode ter um papel crucial na manutenção do estado tumorigênico [30].

A hipótese de Warburg é debatida até hoje na literatura científica. Se a hipótese proposta por Otto Warburg é correta, ou seja, se o câncer é causado por um dano progressivo e sustentado à capacidade respiratória celular, como este dano ocorre e como se traduz em uma transição para um fenótipo tumoral?

1.4. A Mitocôndria e o Câncer

A dinâmica mitocondrial é altamente complexa e responsiva ao estado de crescimento e estresse celular, envolvendo processos de fusão e fissão desta organela [31]. Diversos dados na literatura suportam a hipótese de que a mitocôndria exerce um papel no processo carcinogênico.

Uma compilação de dados experimentais de análise da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica em células tumorais revelou profundas alterações estruturais e funcionais na rede mitocondrial em diversos tipos de tumores humanos. Tais alterações foram reportadas como heterogêneas e não-específicas a um determinado tipo de neoplasia. Predominantemente, foram observados inchaços na matriz, associados com desarranjos e distorções na crista mitocondrial, e cristólise total e parcial. Tais observações são indicativas de que as células de câncer apresentam um elevado impedimento para obtenção de ATP pela respiração mitocondrial [32].

A respiração celular é um processo bastante coordenado que ocorre na mitocôndria e depende da atuação e sinergia de diversos fatores. O proteoma mitocondrial é produto da expressão tanto do genoma mitocondrial quanto nuclear, que atua como regulador deste processo. A expressão coordenada de genes nucleares e mitocondriais é fundamental para a formação dos complexos respiratórios, ocorrendo uma coordenação temporal para síntese dos complexos proteicos necessários à cadeia respiratória, com a expressão nuclear atuando como uma camada de regulação que modela o proteoma mitocondrial [33]. O metabolismo mitocondrial é altamente adaptável e pode responder de maneira eficiente a mudanças fisiológicas e ambientais. Estas respostas necessitam de uma comunicação integrada entre a mitocôndria e o núcleo.

O genoma mitocondrial humano é composto de um DNA circular de 16,6 Kb que codifica 37 genes: 13 genes codificam proteínas, incluindo 7 subunidades do complexo I (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), 1 subunidade do complexo III (citocromo b - Cyt b), 3 subunidades do complexo IV (Cyt c oxidase (COX) I, II e III) e 2 subunidades do complexo V (A6 e A8); os outros 24 genes codificam 2 RNAs ribossomais (rRNA) (12S e 16S) e 22 RNAs transportadores (tRNA), usados para a tradução dos 13 polipeptídeos mencionados, componentes do sistema de fosforilação oxidativo [34]. Em contraste ao material genético nuclear (nDNA) que é composto de nucleoproteínas (DNA enovelado ao redor de octâmeros de histonas) e apresenta

íntrons, o DNA mitocondrial (mtDNA) não apresenta histonas, é composto apenas de éxons e é bastante pequeno. Além disso, os processos de replicação e transcrição do mtDNA são controlados por regiões denominadas D-loop, de modo que qualquer mutação que ocorra nestas regiões podem causar uma inibição em tais processos e uma perda na capacidade respiratória celular [35].

O mtDNA é menor que o nDNA e, por se encontrar constantemente exposto aos radicais livres provenientes do processo de respiração mitocondrial, é muito mais susceptível a danos. O processo de transporte de elétrons que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial é capaz de danificar não apenas o DNA mitocondrial, como as biomoléculas que constituem a organela. Durante o transporte de elétrons ocorre a formação de intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e o ânion peróxido (O_2^{2-}). O superóxido, o peróxido de hidrogênio e os compostos gerados a partir destes, como o radical hidroxila (·OH), são coletivamente definidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) que, na ausência de uma defesa antioxidante adequada, podem ocasionar dano direto às biomoléculas celulares e, por consequência, interferir em sua funcionalidade. Desta forma, a mitocôndria está sujeita a danos oxidativos diretos e constantes que, caso não sejam mitigados, são acumulados danificando suas biomoléculas e estruturas, impactando a capacidade respiratória celular. Estas EROs podem danificar DNA, lipídeos e proteínas, aumentando a produção de EROs com o envelhecimento. É possível que o mtDNA seja um alvo primário de dano oxidativo e, conforme mais cópias do mtDNA mantém as mutações, os complexos da cadeia respiratória se tornam menos eficientes devido a erros de montagem entre os componentes codificados pela mitocôndria e os codificados pelo núcleo. Este acúmulo gradual de dano ocasionaria uma queda progressiva na função mitocondrial e um aumento no tempo de residência dos elétrons, impactando diretamente a capacidade respiratória celular [36].

Mutações no mtDNA que afetam enzimas da cadeia respiratória já foram reportadas em tumores. Quatro mutações conservadas na subunidade I da citocromo oxidase (COI), que faz parte da estrutura do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, e uma mutação na subunidade ATP6, essencial para a função do canal de prótons da ATP sintase (complexo V), já foram reportadas em pacientes com câncer de próstata. Ambas as enzimas COI e ATP6 são codificadas pelo DNA mitocondrial. Para investigar o efeito destas mutações, Petros e

colaboradores, em 2004, inseriram a mutação patogênica ATP6 T8893G do mtDNA em uma linhagem de câncer de próstata (PC3), por transferência em cíbridos, verificando que os cíbridos que receberam a mutação (T8893G) geraram tumores sete vezes maiores em ratos em relação aos cíbridos controle (T8893T) [37].

Existem diversas evidências experimentais associando a disfunção da atividade mitocondrial com a geração de câncer. A este respeito, Chandra e Singh realizaram um apanhado na literatura de diversas proteínas mitocondriais reportadamente encontradas mutadas ou alteradas em diversos tipos de câncer [35], especificadas a seguir. Mutações na succinato desidrogenase (SDH), enzima integrante do complexo II e envolvida na CTE, foram reportadas em formas hereditárias de paranglioma e feocromocitoma. Mutações em três das quatro unidades da SDH (SDHB, SDHC e SDHD) estão envolvidas em processos de tumorigênese ([38–40]). Além disso, mutações no gene SDH5, que codifica uma proteína auxiliar para montagem do complexo SDHD, também é reportado em casos de paranglioma hereditário [41]. Mutações hereditárias na fumarato hidratase (FH), enzima do ciclo do ácido cítrico (CAC), são reportadas em leiomiomas, fibroides uterinos e carcinomas renais [42]. Mutações germinativas e hereditárias em NDUFA13/GRIM-19, uma subunidade essencial do complexo I responsável por sua montagem e atividade, são reportadas em tumores de tireoide. A perda ou redução da expressão deste gene ainda é reportada em casos de carcinoma renal e coloretal [43,44]. Mutações na isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH2), enzima responsável pela conversão de isocitrato a α-cetoglutarato no CAC, foram identificadas em tumores cerebrais, câncer de próstata e leucemia linfoblástica [35]. Além disso, são reportadas mutações do gene que codifica IDH1 que inibem a atividade da IDH1-*wild type* de modo dominante, formando heterodímeros cataliticamente inativos que levam à expressão de fatores de hipóxia e à tumorigênese.

A proteína p53, um importante supressor tumoral, que é encontrado mutado ou tem sua expressão alterada em diversos tipos de câncer humanos, é responsável por modular o balanço energético entre a fosforilação oxidativa mitocondrial e a glicólise em células cancerígenas via TIGAR (*TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) ou pela regulação da PGM (fosfoglicerato mutase) [35]. Estudos sugerem que a p53 ainda é responsável pela regulação da quantidade de mtDNA através da regulação do gene RNR2, um rRNA 16S codificado pela mtDNA [45]. Além das enzimas do CAC ou da CTE, mutações da POLG (polimerase-gama), a única

DNA polimerase conhecida a atuar na mitocôndria humana, são encontradas em 63% dos casos de câncer de mama [46,47]. A POLG mutada ocasiona ainda a depleção do mtDNA, diminuindo a atividade da mitocôndria e promovendo a tumorigenidade [46].

Diminuições na quantidade de mtDNA são reportadas em tumores de mama, renal, hepatocelular, gástrico e de próstata. Uma quase ausência da expressão da subunidade II da citocromo c oxidase, codificada pelo mtDNA, é reportada em mais de 40% dos tumores de mama e ovário [48]. A mitocôndria também é capaz de regular eventos epigenéticos no núcleo. A depleção do mtDNA em diferentes linhagens celulares afetou padrões de metilação do DNA, e a transfecção do mtDNA em células ρ^0 foi capaz de reverter 22 eventos de modificação epigenética (metilação e hipometilação) [49].

Os complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) atuam ainda como importantes moduladores do processo de apoptose. Utilizando mutações no mtDNA que eliminavam completa ou parcialmente a CTE, Kwong e colaboradores em 2007, demonstraram que diferentes respostas celulares de apoptose eram desencadeadas dependendo do tipo de dano à CTE. Células deletadas em sua totalidade nos componentes da CTE se mostraram protegidas da apoptose induzida pelo estresse mitocondrial e do retículo endoplasmático. Células com a CTE íntegra, mas incapazes de gerar um fluxo de elétrons, se mostraram protegidas contra a apoptose mitocondrial, apesar de apresentarem aumento de sensibilidade à apoptose desencadeada pelo estresse do retículo endoplasmático. Já células com uma redução parcial no fluxo de elétrons apresentaram um aumento dos níveis de apoptose em ambas as condições [50]. Desta forma, a disfunção mitocondrial que ocorre nas células cancerígenas pode se apresentar como uma maneira de a célula evitar o processo de apoptose, ainda que esteja danificada bioquimicamente, e sobreviver em tal situação.

A presença de uma mitocôndria saudável é fundamental para inibição de vias oncogênicas e manutenção do fenótipo diferenciado da célula. Elliot e colaboradores, em 2012, conduziram experimentos de transfecção mitocondrial entre células saudáveis mamárias e tumorais de câncer de mama, verificando que o fenótipo tumoral era suprimido quando mitocôndrias saudáveis eram transferidas para um citoplasma tumoral. Por outro lado, o fenótipo tumoral era estimulado

quando mitocôndrias de células tumorais eram transferidas para um citoplasma saudável [51].

Kaiparretu e colaboradores, em 2013, analisaram o potencial de reversão de propriedades oncogênicas em linhagens celulares altamente metastáticas pela introdução de mitocôndrias de células saudáveis (não-cancerígenas). Os cíbridos com mitocôndrias saudáveis apresentaram um grande aumento no desempenho mitocondrial, incluindo síntese de ATP, consumo de oxigênio e atividade da cadeia respiratória, quando comparados com os cíbridos de mitocôndrias cancerosas. Além disso, as mitocôndrias benignas foram capazes de reverter diversas características oncogênicas da linhagem 143B-TK (osteosarcoma humano), como proliferação celular, viabilidade sob hipóxia, propriedades anti-apoptóticas, resistência a drogas contra o câncer, invasão, formação de colônias e crescimento tumoral *in vivo* em ratos. Análise de microarranjo sugere ainda que diversas vias oncogênicas foram inibidas em cíbridos que receberam mitocôndrias saudáveis, em relação aos transplantados com mitocôndrias tumorais. Segundo os pesquisadores, a mitocôndria desempenha um papel fundamental na reversão de propriedades oncogênicas sob um *background* nuclear cancerígeno e seria um alvo promissor para terapias contra a doença [52].

Thomas N. Seyfried revisa e discute profundamente diversos dados disponíveis da literatura, defendendo a interpretação do câncer como uma doença metabólica mitocondrial. Segundo esta interpretação, na presença de um dano respiratório sustentado ocorre um aumento da expressão de oncogenes e uma diminuição na expressão de genes supressores de tumor, de modo a adaptar o metabolismo celular à nova condição bioenergética. Desta forma, a célula retornaria a um estado bioenergético “primitivo” (padrão de expressão gênico e comportamento metabólico de uma célula não-diferenciada), obtendo ATP preferencialmente pela via fermentativa (não-oxidativa), por fosforilação a nível de substrato [7–9]. A perda progressiva da capacidade respiratória celular ocasionaria um aumento na expressão de vias oncogênicas, desencadeando um processo de transformação metabólica celular que culmina com o desenvolvimento irreversível do fenótipo cancerígeno.

Tais evidências sugerem que a mitocôndria é um importante supressor tumoral e, por apresentar uma estrutura, função e sinalização altamente complexa, deve ter sua homeostase rigorosamente controlada. A perda da funcionalidade

mitocondrial ocasiona uma desimbiose que desregula bioquimicamente a célula, gerando o fenótipo / genótipo cancerígeno.

Como o dano à capacidade respiratória celular se traduz em resposta na expressão de genes nucleares característicos da assinatura metabólica tumoral (aumento da expressão de oncogenes e diminuição da expressão de genes supressores de tumor) e na instabilidade genômica observada nestas células? Esta comunicação mitocôndria-núcleo ocorre por uma via de sinalização sensível capaz de interpretar sinais da perda da capacidade respiratória e controlar uma resposta de expressão nuclear adequada a esta nova condição. Trata-se da via de sinalização retrógrada, primeiramente desvendada e descrita na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5. A Via de Sinalização Retrógrada

A mitocôndria exerce múltiplas funções na célula além da respiração celular, sendo essencial para a biossíntese de intermediários metabólicos, regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico, coordenação da morte celular, entre outros. Devido à vasta gama de funções desempenhadas pela mitocôndria, existe a necessidade de uma via bioquímica capaz de interpretar sinais de dano, disfunção ou perda do perfil bioquímico desta organela, de modo a ativar uma resposta compensatória nuclear e ajustar o metabolismo celular de acordo [53]. As adaptações à disfunção mitocondrial são amplamente difundidas e descritas em diversos organismos e envolve vias anterógradas (do núcleo para a mitocôndria), retrógradas (da mitocôndria para o núcleo) e intermitocondriais [54].

A primeira via retrógrada a ser descrita e extensivamente caracterizada foi a via de sinalização retrógrada (via RTG) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A via RTG evoluiu em microrganismos eucariotos para manter a viabilidade celular após um período de dano à produção de ATP pela via respiratória (oxidativa). Esta via depende da atuação de três proteínas citosólicas: Rtg1p, Rtg2p e Rtg3p. Quando a via RTG é ativada, o complexo Rtg1-Rtg3p é translocado do citoplasma para o núcleo, onde controla a expressão de genes que codificam proteínas mitocondriais e de vias necessárias à adaptação metabólica à condição de dano respiratório. Rtg1p e Rtg3p são fatores de transcrição do tipo básico hélice-*loop*-hélice / leucina *zipper* (bHLH/LeuZip) que se ligam como heterodímeros ao sítio de ligação GTCAC no

DNA, chamado de R Box. Apesar de apenas Rtg3p conter o domínio de ligação ao DNA, Rtg1p e Rtg3p são ambos necessários para ligação ao DNA. A translocação de Rtg1-Rtg3p para o núcleo é dependente da desfosforilação parcial de Rtg3p. A alteração do estado de fosforilação de Rtg3p é mediada por Rtg2p. Quando a via de sinalização retrógrada está inativa, o estado hiperfosforilado de Rtg3p é mantido, impedindo sua translocação para o núcleo. A inibição do processo de desfosforilação é mediada por Mks1p, uma fosfoproteína citosólica, quando esta se encontra hiperfosforilada e ligada à Bmh1/2p [31]. A Figura 1 esquematiza o mecanismo de ativação da via RTG em *Saccharomyces cerevisiae*.

Rtg2p é um ponto central de regulação da via de sinalização retrógrada, visto que Rtg3p totalmente fosforilada não pode ser translocada para o núcleo, e sua desfosforilação é dependente da atividade de Rtg2p. Rtg2p atua como o sensor da disfunção mitocondrial e, consequentemente como ativador da via de sinalização retrógrada. Quando a via RTG está ativa, Rtg2p liga-se à forma hiperfosforilada de Mks1p, impedindo-o de se ligar à Bmh1/2p, permitindo, portanto, a desfosforilação parcial de Rtg3p e, consequentemente, a translocação do complexo Rtg1-Rtg3p para o núcleo, ativando a via RTG. Rtg2p possui um domínio N-terminal HSP70-like e de ligação de ATP necessário para interação com Mks1p. Desta forma, Mks1p atua como um “interruptor” dinâmico da via RTG: quando ligado à Rtg2p, a via RTG está ativa; quando ligado a Bmh1/2p, está inativa. Os níveis de Mks1p na célula são controlados por degradação do Mks1p livre por poliubiquitinação dependente de SCF_{Grr1} E3 ubiquitina ligase, aumentando a eficiência do controle Rtg2p/Bmh1/2p, por manter baixos os níveis de Mks1p. Além de sua função como ativador da translocação de Rtg1-Rtg3p para o núcleo, Rtg2p também é um componente do complexo transcricional coativador SAGA-like (SLIK), necessário para a expressão de *CIT2*, típico gene repórter da via de sinalização RTG, que codifica uma isoforma peroxissomal da citrato sintase, necessária ao ciclo do glioxilato [55]. Rtg2p ainda exerce um papel em promover a estabilidade genômica no núcleo, apesar de o mecanismo por meio do qual esta proteção ocorre ainda não é evidenciado completamente [56].

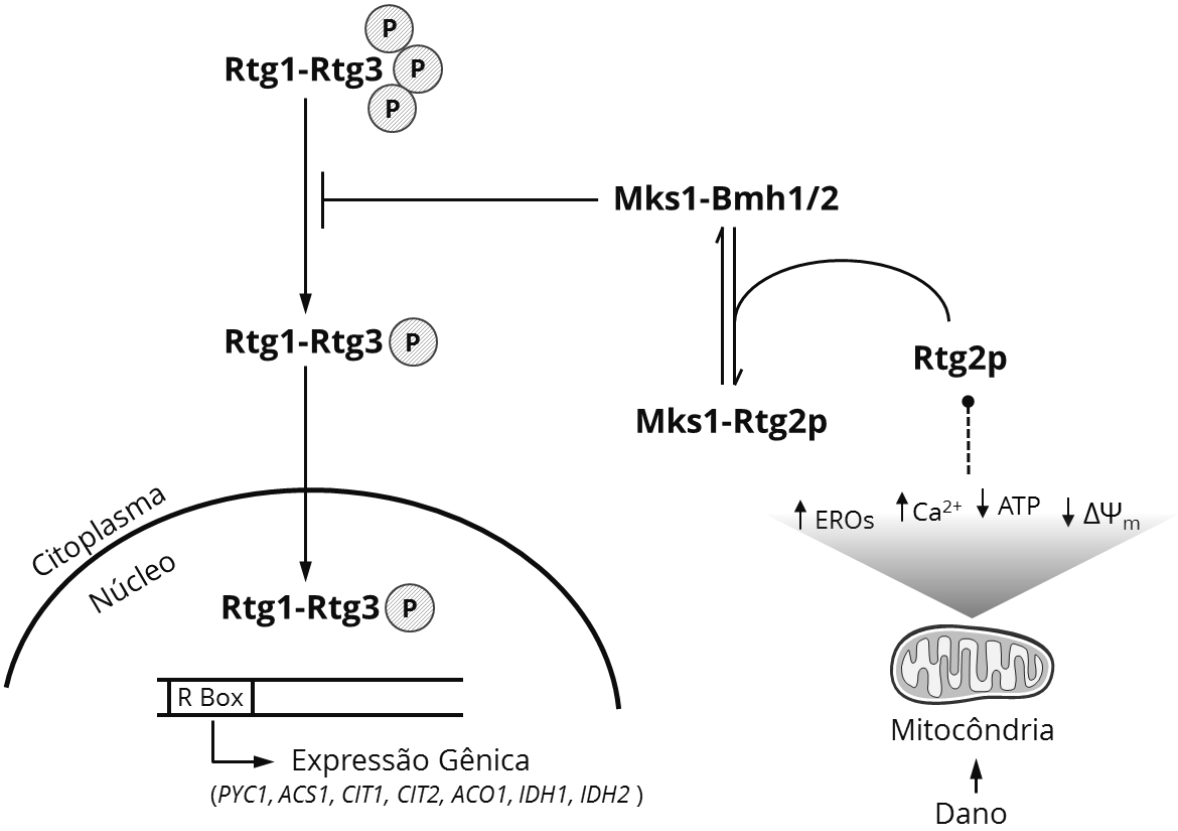

Figura 1. Mecanismo da Via de Sinalização Retrógrada (RTG) em *Saccharomyces cerevisiae*. Variações de diversos sinais provenientes da mitocôndria mediante dano à organela sinalizam a disfunção mitocondrial. Rtg2p atua como sensor transdutor deste sinal, ativando a via RTG e promovendo a expressão de genes associados à resposta metabólica retrógrada ($\Delta\Psi_m$: potencial da membrana mitocondrial, EROS: Espécies reativas de oxigênio, *PYC1*: piruvato carboxilase, *ACS1*: acetil-coenzima A sintetase, *CIT1*: citrato sintase, *CIT2*: citrato sintase peroxissomal, *ACO1*: aconitase, *IDH1/2*: isocitrato desidrogenase) (adaptado de Cunha, Torelli & Kowaltowski, 2015 [55]).

Danos mitocondriais que culminam com perda da eficiência na cadeia respiratória podem ocasionar danos às reações do ciclo do ácido cítrico (CAC). A via de sinalização retrógrada tem como principal função compensar a atividade de um CAC truncado, adaptando o metabolismo celular de modo a permitir o fornecimento de intermediários de biossíntese em condições de dano respiratório. O CAC é uma via de extrema importância para o fornecimento de precursores para biossíntese de outras moléculas, especialmente o citrato. Desta forma, a via RTG está relacionada à reprogramação metabólica da levedura à disfunção mitocondrial, através da ativação de reações anapleróticas e do ciclo do glioxilato. De modo geral, em *S. cerevisiae,* a regulação metabólica gerada pela ativação da via RTG afeta a

expressão de genes necessários à modulação da síntese de intermediários do CAC em condições de disfunção mitocondrial [55].

O ciclo do glioxilato, uma das vias anapleróticas ativadas pela via RTG, está presente em fungos, plantas e bactérias, mas não em mamíferos. O ciclo do glioxilato exerce um papel anaplerótico, fornecendo precursores para biossíntese. O ciclo do glioxilato conta com algumas reações do CAC, de modo que substratos de dois carbonos, que adentram no ciclo como acetil-CoA, podem ser convertidos em compostos de quatro carbonos, que podem ser metabolizados para síntese de açúcares e outros compostos orgânicos essenciais. Apesar de algumas reações entre o CAC e o ciclo do glioxilato serem as mesmas, muitas delas são catalisadas por diferentes isoenzimas em compartimentos celulares diferentes. Enquanto que o CAC ocorre na mitocôndria, o ciclo do glioxilato ocorre no citoplasma e no peroxissomo, sendo, portanto, uma resposta metabólica adequada à disfunção mitocondrial [57,58]. A utilização de compostos de dois carbonos pela levedura requer uma coordenação e regulação entre o CAC e o ciclo do glioxilato. O succinato sintetizado no ciclo do glioxilato adentra o CAC, onde é convertido em malato que, por sua vez, retorna ao citoplasma, sendo convertido em oxaloacetato.

As três primeiras enzimas do CAC, citrato sintase (Cit1p), aconitase (Aco1p) e isocitrato desidrogenase (Idh1/2p) devem permanecer ativas para gerar α-cetoglutarato, que será convertido em glutamato, que atua como doador de nitrogênio para biossíntese. Desta forma, os genes que codificam estas enzimas, *CIT1*, *ACO1*, *IDH1/2*, respectivamente, são induzidos pela resposta retrógrada. Para esta condição ser mantida, o CAC precisa ser abastecido de citrato que, por sua vez, é mantido em células com a respiração disfuncional pela ativação do ciclo do glioxilato. Estudos sugerem que o aumento da expressão de *CIT2* (citrato sintase peroxissomal) pela resposta retrógrada facilita um uso eficiente de carbono via transferência dos metabólitos do ciclo do glioxilato para o CAC. Esta cooperação com o ciclo do glioxilato permite que o CAC atue como uma fonte de glutamato necessário para biossínteses celulares, mesmo na presença de uma disfunção respiratória [31].

O ciclo do glioxilato, por sua vez, requer uma fonte de acetil-CoA para sua manutenção, que pode ser fornecido pela β-oxidação de ácidos graxos ou a partir de outras fontes. O CAC ocorre na matriz mitocondrial, enquanto que o ciclo do glioxilato e a β-oxidação de ácidos graxos ocorrem nos peroxissomos, de modo que

a ativação da via RTG é acompanhada de um aumento na quantidade peroxissomal, consistente com a geração de acetil-CoA para abastecer o ciclo do glioxilato. O suprimento de oxaloacetato para o CAC também pode ser mantido por conversão anaplerótica de piruvato a oxaloacetato, em uma reação iniciada pela piruvato carboxilase, codificada pelo gene *PYC1*, também regulado pela via RTG. A conversão de oxaloacetato a citrato no CAC depende do fornecimento de acetil-CoA, que também pode ser mantido pela conversão do acetato (sintetizado a partir do piruvato) a acetil-CoA pela ação da enzima acetil-coenzima A sintetase, codificada pelo gene *ACS1*, cuja expressão também é regulada pela via RTG [31]. A Figura 2 resume a resposta metabólica induzida pela via RTG na levedura.

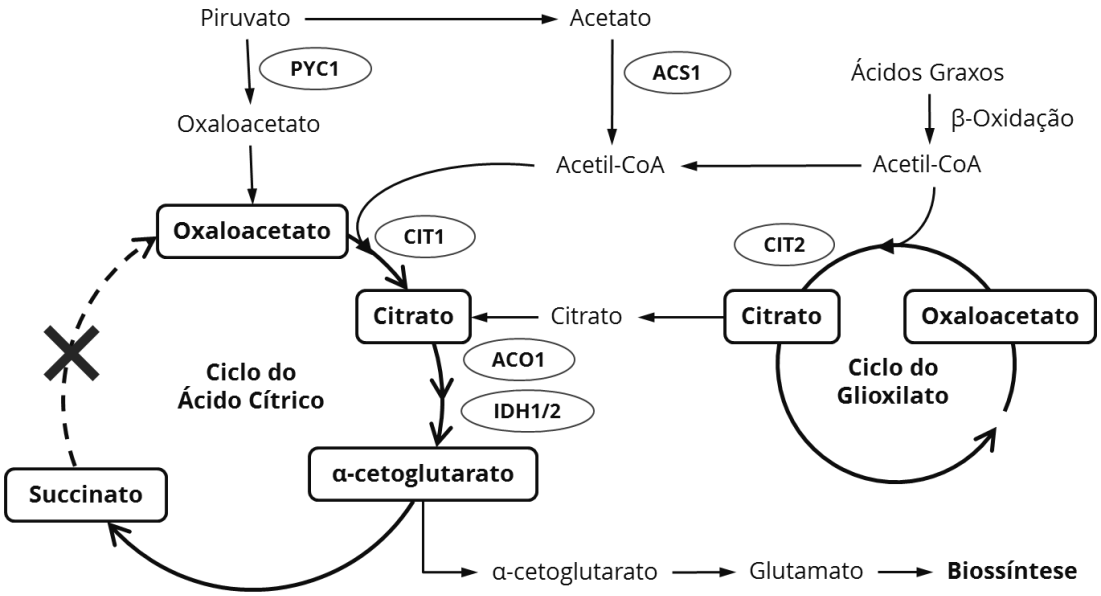

Figura 2. Resposta metabólica induzida pela via retrógrada (RTG) em *Saccharomyces cerevisiae* (X: interrupção ou disfunção do ciclo, *PYC1*: piruvato carboxilase, *ACS1*: acetil-coenzima A sintetase, *CIT1*: citrato sintase, *CIT2*: citrato sintase peroxissomal, *ACO1*: aconitase, *IDH1/2*: isocitrato desidrogenase) (adaptado de Jazwinski, 2013 [31]).

A resposta retrógrada relaciona alterações de estresse nutricional, disfunção mitocondrial e envelhecimento com adaptações no metabolismo, regulação gênica e estabilidade genômica [59]. A modulação metabólica transiente mediada pela via RTG é necessária à adaptação celular em condições de dano respiratório, mantendo os níveis de ATP e fontes de precursores biossintéticos necessários às atividades celulares enquanto outras vias são paralelamente mobilizadas para recuperar o status mitocondrial, estruturando um conjunto coordenado de respostas celulares

denominado *mitocheckpoint* [60]. O *mitocheckpoint* é um mecanismo de controle que monitora o estado funcional da mitocôndria, ajustando a resposta do ciclo celular e a expressão gênica de modo a auxiliar na recuperação e normalização da função mitocondrial quando ocorre algum tipo de dano ou disfunção à organela. O *mitocheckpoint* garante a coordenação dos eventos celulares, impedindo ou atrasando o progresso do ciclo celular em resposta ao dano ao mtDNA, impedindo a produção de células defeituosas na função mitocondrial [60]. Para que vias essenciais à recuperação mitocondrial possam atuar de modo efetivo, a adaptação metabólica mediada pela via retrógrada é fundamental para manter a viabilidade das funções celulares até que a atividade mitocondrial seja restaurada.

Células de mamíferos também respondem à perda da função mitocondrial com alterações no padrão de expressão gênica nuclear. A natureza da sinalização retrógrada de estresse mitocôndria-núcleo em células de mamíferos ocorre possivelmente devido a uma queda no potencial de membrana mitocondrial, o que ocasiona um aumento na concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma. Tal aumento ativa uma série de proteínas fosfatases e quinases sensíveis ao cálcio que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que atuam modelando a expressão gênica à nova condição metabólica [61]. Assim como a via RTG é uma resposta celular na levedura diante da disfunção mitocondrial, em células de mamíferos ocorre a ativação de cascatas de sinalização dependentes de cálcio que envolvem os fatores de transcrição NF-κB, NFAT e ATF [61].Tal resposta induz um comportamento invasivo em células saudáveis, indicando uma relação com a progressão tumoral [62,63]. A disfunção da capacidade respiratória mitocondrial também ativa a via de sobrevivência Akt, que ocasiona um aumento no perfil invasivo e garante vantagens de sobrevivência em condições de hipóxia, com um aumento da glicólise celular para crescimento e proliferação [64,65].

Na resposta retrógrada de mamíferos, NF-κB é translocado do citoplasma para o núcleo, onde atua na transcrição de genes de resposta geral ao estresse. Desta forma, a via RTG de *Saccharomyces cerevisiae* e a via NF-κB de células de mamíferos parecem ser vias de conservadas de resposta ao estresse para garantir adaptabilidade e sobrevivência celular [66,67]. Durante a ativação da resposta retrógrada em células de mamíferos, ocorre ativação do fator de transcrição heterodimérico Myc-Max, regulado por NF-κB. O fator de transcrição Myc é do tipo básico hélice-*loop*-hélice/leucina *zipper* (bHLH/LeuZip), apresentando homologia

estrutural com o heterodímero Rtg1p-Rtg3p de *Saccharomyces cerevisisae*, segundo análises de Bioinformática [67]. Desta forma, Myc-Max e o regulador *upstream* NF-κB exercem uma função na via retrógrada de mamíferos semelhante à exercida por Rtg1p-Rtg3p em levedura. Ainda não foram identificados homólogos de Rtg2p em eucariontes superiores. O fato de NF-κB em mamíferos estar envolvido na manutenção da estabilidade cromossômica, coregulação da respiração mitocondrial e comunicação com a via TOR (*Target of Rapamycin*) indica uma conservação funcional da via entre células humanas e *Saccharomyces cevrevisiae* [66].

O tipo de sinal de disfunção mitocondrial que ativa a via retrógrada em *Saccharomyces cerevisiae* e em mamíferos e como ocorre a transdução deste sinal dentro da célula ainda não é completamente evidenciado. Devido à complexidade do processo respiratório, a mitocôndria é capaz de gerar diversos tipos de sinais que indicam disfunção bioquímica, como flutuações na produção de ATP, variações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), comprometimento na absorção de cálcio, geração de peptídeos mitocondriais no espaço intermembranar, variação no transporte de proteínas e geração de concentrações desbalanceadas de espécies reativas de oxigênio [55,68]. O dano respiratório pode surgir a partir de anormalidades na estrutura mitocondrial, danos ao mtDNA, no CAC, na CTE, no gradiente de prótons que mantém o potencial da membrana mitocondrial ou a partir de danos às biomoléculas da mitocôndria. Em outras palavras, qualquer interrupção no processo de respiração mitocondrial, que é altamente complexo e multifatorial, pode desencadear uma resposta retrógrada (RTG).

Mas como a via de sinalização retrógrada se relaciona com a origem do câncer?

1.6. A Origem do Câncer: Uma Dinâmica Adaptativa

Thomas N. Seyfried propõe uma origem extracromossômica para o câncer: a disfunção respiratória mitocondrial [8,9]. Segundo esta teoria metabólica, o câncer se origina a partir de diversos eventos não específicos que danificam a capacidade respiratória celular ao longo do tempo. Tais eventos podem surgir por agentes externos ou internos que danificam a mitocôndria de modo progressivo e cumulativo [69,70]. Na presença de um dano respiratório ocasionado pela disfunção mitocondrial, ocorre a ativação de vias de *mitocheckpoint*, cujo objetivo é a manutenção da

viabilidade celular na presença da disfunção respiratória, com a mobilização paralela de agentes de reparo para recuperar a funcionalidade mitocondrial [60]. Durante estre processo, a via retrógrada atua como um mensageiro do estado funcional da mitocôndria, ocasionando uma modulação metabólica e de expressão adequada à nova condição.

No caso de um dano severo, o *mitocheckpoint* pode não ser suficiente para a recuperação da funcionalidade mitocondrial e, neste caso, a célula ativa sinalizações e eventos de apoptose. No entanto, na presença de um dano mitocondrial contínuo ou persistente, a modulação adaptativa celular ocorre de modo a ajustar progressivamente a célula à nova condição metabólica, e não mais a restabelecer de suas funções normais. Em outras palavras, os eventos de recuperação celular são progressivamente desviados para os de adaptação celular. Nestes casos, ocorre uma progressiva supressão das funções mitocondriais, com uma consequente evasão da apoptose e inativação de vias dependentes da mitocôndria, ocasionando um aumento permanente do perfil fermentativo com a manutenção do efeito Warburg. Com a perda da capacidade respiratória e a supressão das funções mitocondriais, ocorre uma perda da simbiose da mitocôndria com o restante da célula, fazendo com que a célula retorne a um estado metabólico mais “primitivo”, de elevada proliferação e com metabolismo predominantemente fermentativo. O desenvolvimento carcinogênico ocorre apenas naquelas células que, ao longo deste processo adaptativo, foram capazes de elevar a capacidade de obter energia a partir da fosforilação a nível de substrato (fermentação) para manter o nível energético necessário à manutenção das atividades celulares. Além da fermentação de glicose a lactato, diversas células cancerígenas também fermentam glutamina na mitocôndria [8]. O aumento da expressão de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor são eventos que se tornam necessários para manter a viabilidade das células incipientes que apresentam a respiração danificada [60]. Com a desregulação gênica de oncogenes e genes supressores de tumor, a célula passa a apresentar uma desregulação nos eventos de controle do ciclo celular, mantendo elevadas taxas de replicação, proliferação e potencial invasivo.

A constante modulação da expressão gênica e da adaptação metabólica mediada, dentre outras, pela via de sinalização retrógrada mitocôndria-núcleo, ocasiona elevada instabilidade genômica nuclear e o surgimento de eventos mutacionais. O conjunto metabólico e gênico (fenótipo e genótipo) resultante deste

processo de dano mitocondrial progressivo define a célula como cancerígena. A dinâmica do processo está detalhada na Figura 3.

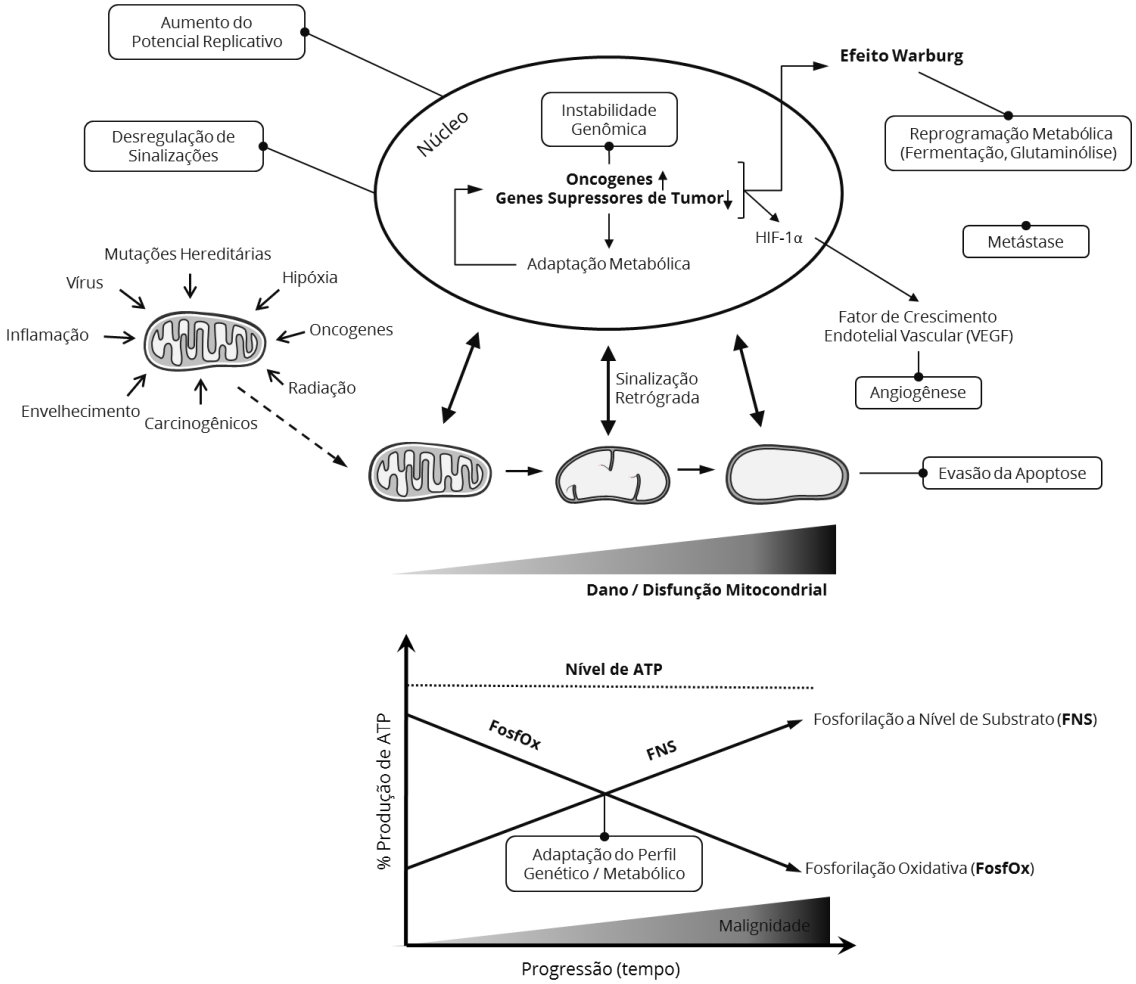

Figura 3. Disfunção respiratória mitocondrial como a origem do câncer. Na presença de um dano mitocondrial contínuo ou persistente, a modulação adaptativa celular ocorre de modo a ajustar progressivamente a célula à nova condição metabólica, e não mais a restabelecer de suas funções normais. Ocorre uma progressiva supressão das funções mitocondriais e inativação de vias dependentes da mitocôndria, ocasionando o fenótipo / genótipo tumoral (adaptado de Seyfried et al, 2014 [9]).

1.7. *Saccharomyces cerevisiae* como Modelo de Estudo para o Câncer

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo frequentemente utilizado como modelo de estudo para células eucarióticas. Devido à semelhança bioquímica com a célula animal, à facilidade de manipulação genética e bioquímica e à disponibilidade de recursos em genômica funcional e análise ômicas para esta

levedura, este eucarioto unicelular foi estabelecido como uma ferramenta valiosa para a investigação bioquímica [66].

Diversos prêmios Nobel foram agraciados a descobertas realizadas utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo: a descoberta da fermentação livre de células (Nobel Química - E. Buchner, 1907); a descoberta das enzimas fermentativas (Nobel Química - A. Harden & H. Euler-Chelpin, 1929); a primeira determinação do papel do tRNA (Nobel Fisiologia ou Medicina - R. Holey, H. Khorana & M. Nirenberg, 1968); descoberta dos mecanismos de transporte e localização de proteínas dentro da célula (Nobel Fisiologia ou Medicina - G. Blobel, 1999); a descoberta do papel das ciclinas no controle do ciclo celular (Nobel Fisiologia ou Medicina - L. Hartwell, T. Hunt & P. Nurse, 2001); a degradação proteica mediada pela ubiquitina (Nobel Química - A. Ciechanover, A. Hershko & I. Rose, 2004); as bases moleculares da transcrição eucariótica (Nobel Química - R. Kornberg, 2006); a descoberta da telomerase e sua relação com o envelhecimento e a proteção cromossômica (Nobel Fisiologia ou Medicina - E. Blackburn, C. Greider & J. Szostak, 2009); a descoberta dos mecanismos reguladores do tráfego de vesículas intracelulares (Nobel Fisiologia ou Medicina - J. Rothman, R. Schekman & T. Südhof, 2013); a descoberta dos mecanismos de autofagia (Nobel Fisiologia ou Medicina – Y. Ohsumi, 2016). Tais avanços científicos conquistados utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consolidaram sua reputação como importante modelo celular eucariótico para pesquisa.

A *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma totalmente sequenciado. Atualmente, bancos de dados contendo coleções completas de deleções de todas as ORFs (*Open Reading Frames*) de *S. cerevisiae* encontram-se disponíveis comercialmente. Além disso, bibliotecas de ORFs fusionadas a *tags* de expressão também estão disponíveis, o que facilita a realização de estudos de imunoprecipitação e interação proteica. Alguns dos exemplos mais importantes incluem ORFs fusionadas à proteína verde fluorescente (GFP - *Green Fluorescent Protein*), o que permite a determinação da sua localização celular em diferentes condições [71]. Além da disponibilidade de mutantes de deleção de todos os genes, ferramentas sofisticadas de análise bioquímica e genética encontram-se disponíveis para análises de expressão gênica e genômica funcional [60].

Cerca de 47% dos genes de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam homologia estrutural ou funcional com genes humanos [131], 43% dos genes essenciais desta levedura podem ser substituídos por seus ortólogos humanos correspondentes sem perda de funcionalidade ou viabilidade celular [72] e 17% dos genes de *S. cerevisiae* (aproximadamente 1000 genes) são membros de famílias de genes ortólogos associados a diversos tipos de doenças humanas [71]. Desta forma, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa uma importante ferramenta para o estudo de diversas condições biológicas e doenças humanas, incluindo o câncer. Para genes que não possuem ortólogos, a levedura geralmente apresenta uma via de ação análoga à via de ação do gene humano, de modo que o gene pode ser expresso de forma heteróloga em *S. cerevisiae* e o fenótipo resultante pode ser estudado.

Diversas instituições de pesquisa de câncer em todo o mundo fazem uso da genética de leveduras como parte de sua estratégia de pesquisa, simulando nesse modelo as alterações patológicas observadas nas células cancerígenas. Diversas características das células de câncer resultam da desregulação de processos biológicos fundamentais como ciclo celular, síntese proteica, biogênese mitocondrial, regulação retrógrada mitocondrial, atividade de proteasoma e autofagia, todos primeiramente caracterizados de modo detalhado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* [66]. Uma vez que tais processos são altamente conservados entre espécies, estudos de genética e genômica funcional em levedura são de grande relevância para a compreensão da bioquímica humana e do fenótipo e genótipo cancerígeno.

A investigação dos processos mitocondriais em levedura fornece dados importantes para a compreensão da dinâmica mitocondrial em células humanas [73], principalmente devido à similaridade bioquímica entre mtDNA da levedura e de humanos [74]. Por exemplo, o primeiro gene codificante para uma DNA polimerase mitocondrial (MIP1) foi descoberto em levedura [75]. Muito da compreensão acerca da mitocôndria foi originado a partir de estudos em *Saccharomyces cerevisiae*. Desta forma, a levedura ainda se torna um modelo interessante para o estudo do câncer como uma doença metabólica mitocondrial, visto que a *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de se manter viável e sobreviver na ausência de mitocôndria funcional, desde que seja fornecida uma fonte de carbono fermentável. Mutações no mtDNA (ρ^-) ou a perda total do mtDNA (ρ^0) inativam o processo de fosforilação oxidativa, visto que a

célula se torna incapaz de expressar as subunidades proteicas adequadas à estruturação do processo de respiração celular. Em tais condições, a célula se torna respiratório-deficiente e, portanto, incapaz de metabolizar fontes de carbono não-fermentáveis. No entanto, a viabilidade celular pode ser mantida na metabolização de uma fonte de carbono fermentável (como a glicose), que é substrato para a via glicolítica, o que permite o estudo do fenótipo resultante da disfunção mitocondrial. As células respiratório-deficientes são frequentemente denominadas *petites*, devido ao fenótipo de tamanho de colônia reduzido. A relativa facilidade de identificar mutantes *petites* em *Saccharomyces cerevisiae* permite investigar os efeitos da depleção do mtDNA e do dano respiratório sobre o perfil celular [76], auxiliando na identificação de processos celulares e na investigação dos mecanismos genéticos envolvidos na apoptose e na elevada instabilidade genômica, que são relevantes para a compreensão do desenvolvimento do câncer em células humanas [60].

A *S. cerevisiae* exibe ainda uma característica metabólica que a torna um modelo interessante e único para estudo de doenças que envolvem reprogramação do metabolismo energético, como é o caso do câncer. Quando há elevada quantidade de glicose no meio, a levedura fermenta mesmo em presença de oxigênio, num processo denominado Efeito Crabtree (repressão catabólica pela glicose). Há uma grande semelhança metabólica entre o efeito Crabtree da levedura e o efeito Warburg da célula tumoral. Em ambos os casos ocorre uma regulação negativa do metabolismo oxidativo respiratório associado a um aumento da fermentação, independente da presença de oxigênio. No entanto, enquanto o efeito Warburg surge como uma adaptação irreversível, o efeito Crabtree é uma modulação transiente e reversível ocasionada pela elevada concentração de glicose no meio. Desta forma, a levedura em fase de crescimento exponencial em meio contendo excesso de glicose apresenta um metabolismo energético semelhante ao de uma célula tumoral, ou seja, fermentação aeróbica com supressão da via respiratória (oxidativa). Isso aponta a *S. cerevisiae* como modelo metabólico favorável para a triagem de drogas para terapias anti-tumorais cujo alvo é o metabolismo e para investigação metabólica [20]. Apesar de as bases metabólicas e bioquímicas da repressão catabólica serem bem estabelecidas na levedura *S. cerevisiae*, as bases do efeito Warburg nas células cancerígenas ainda permanece controverso, apesar da semelhança metabólica com o efeito Crabtree.

Durante o crescimento em meio contendo glicose como fonte de carbono, a levedura *S. cerevisiae* apresenta três estágios de desenvolvimento metabólico, que se inicia com uma fase de crescimento exponencial fermentativo quando a fonte de carbono disponível é a glicose. Nesta fase, conhecida como primeira fase exponencial do crescimento, as células apresentam metabolismo fermentativo, devido à repressão catabólica exercida pela glicose sobre genes necessários à respiração. Nesta fase, a glicose disponível é metabolizada pela via glicolítica a piruvato que, em seguida, é fermentado a etanol, para regenerar o NAD^+ citoplasmático. A elevada taxa fermentativa na primeira fase exponencial de crescimento é acompanhada de uma elevada multiplicação celular. Uma vez que a glicose é metabolizada a etanol, as células entram em uma fase adaptativa denominada diauxia, na qual ocorre uma remodelação do metabolismo para o processamento do etanol, que é a nova fonte de carbono disponível. Durante a diauxia, não ocorre multiplicação celular. Após a adaptação metabólica, as células voltam a se multiplicar, metabolizando o etanol disponível pela via respiratória (via oxidativa. Esta fase é denominada segunda fase exponencial, ocorrendo multiplicação celular a uma taxa mais lenta que na primeira fase exponencial. Quando esta fonte de carbono acaba, as células entram em fase estacionária, e cessam sua multiplicação.

Ao substituir a glicose pelo glicerol como fonte de carbono, a levedura é forçada a obter sua energia unicamente através da via oxidativa (respiração celular). O glicerol é fosforilado por uma glicerol quinase (Gut1p), gerando glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato gerado é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) pela enzima glicerol fosfato ubiquinona oxirredutase (Gut2p), localizada na superfície da membrana mitocondrial interna. Os elétrons desta oxidação são transferidos para a ubiquinona, entrando na cadeia respiratória [77,78]. DHAP entra na via glicolítica, gerando NADH (no citoplasma) e piruvato, que segue para a via respiratória. Glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gpd1/2p) auxilia na re-oxidação do NADH citoplasmático [79]. Quando o metabolismo respiratório é adotado pela levedura, ela se torna metabolicamente mais próxima às células saudáveis dos organismos multicelulares [80].

II. OBJETIVOS

Sobre propósito:

" Muito mais poderoso do que a motivação de resolver a nossa vida é a motivação de acessar a sabedoria que diz respeito a todos e que pode beneficiar incontáveis vidas."

- Gustavo Gitti, 2016

2. OBJETIVOS

Investigar o papel exercido por Rtg2p e, consequentemente, pela via de sinalização retrógrada (RTG), sobre o perfil metabólico e a remodelação genética em *Saccharomyces cerevisiae*, comparando-o ao processo de transformação tumoral observado em células humanas.

Objetivos Específicos:

1) Avaliar o efeito da perda da via de sinalização retrógrada pela deleção da proteína Rtg2p em *Saccharomyces cerevisiae* sobre o balanço bioenergético em metabolismo fermentativo (repressão catabólica) e respiratório, e sobre o perfil mitocondrial;

2) Investigar o efeito do dano mitocondrial sustentado sobre de remodelação metabólica e genética (transformação) em *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando a expressão de genes relacionados ao padrão de expressão e à assinatura bioenergética semelhantes à transformação metabólica observada no processo de transformação celular tumoral.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Sobre busca:

Quem dera eu achasse um jeito
de fazer tudo perfeito,
feito a coisa fosse o projeto
e tudo já nascesse satisfeito

- Paulo Leminski

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Composição dos Meios de Cultivo

YPD 2% líquido: 1% (p/v) extrato de lêvedo, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glicose
YGly 4% líquido: 1% (p/v) extrato de lêvedo, 2% (p/v) peptona, 4% (p/v) glicerol
Meio sólido: + 2% (p/v) ágar

3.2. Cepas / Estoque

A cepa haploide de *Saccharomyces cerevisiae wild type* (WT) (BY4741; MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0) e suas derivadas *knockout rtg2Δ* (BY4741; MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL252c::kanMX4) e *rtg3Δ* (BY4741; MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YBL103c::kanMX4) foram obtidas da EROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis , Frankfurt - Germany).

A cepa WT foi estocada em meio sólido YPD. No caso das mutantes *rtg2Δ* e *rtg3Δ*, o meio sólido continha ainda 200 $mg.L^{-1}$ de geneticina como marcador seletivo. Foi feito um repique fresco das cepas 48 h antes do inóculo para realização dos experimentos.

3.3. Condições de Cultivo / Crescimento

As células foram cultivadas em meio líquido YPD ou meio líquido YPGly, em frascos de erlenmeyer preenchidos com 1/5 de seu volume com o meio de cultivo, e incubadas a 28°C e 160 rpm. Quando crescidas em YPD, as células foram coletadas em metabolismo fermentativo (primeira fase exponencial) ou metabolismo respiratório (segunda fase exponencial) para realização dos experimentos.

Para a determinação da concentração celular, foi realizada leitura espectrofotométrica da suspensão celular a 570 nm, utilizando a lei de Lambert-Beer para obtenção da concentração da suspensão em peso seco. O fator de peso seco (f) foi determinado a partir da construção de uma curva de peso seco. Para tal, um volume adequado de uma suspensão celular a uma determinada concentração úmida (peso úmido $mg.mL^{-1}$) foi filtrado em filtro Milipore (0,45 μm) e as células retidas foram secas sob luz infravermelha por 1 h, até peso constante,

determinando-se, desta forma, a concentração celular em peso seco da suspensão (peso seco $mg.mL^{-1}$). A partir da suspensão inicial foram preparadas soluções diluídas, cujas absorbâncias foram lidas a 570 nm, determinando-se o fator de peso seco pela curva de ajuste.

3.4. Curva de Crescimento

As cepas foram inoculadas em meio YPD nas concentrações de 0,2 $\mu g.mL^{-1}$, 0,5 $\mu g.mL^{-1}$, 1 $\mu g.mL^{-1}$, 3 $\mu g.mL^{-1}$ e por inóculo de alçada. Os cultivos foram incubados a 28°C e 160 rpm por aproximadamente 17 h. Após este período, foram coletadas alíquotas dos inóculos a cada 40 minutos. As concentrações celulares (peso seco) das alíquotas coletadas foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 570 nm, construindo-se uma curva [Concentração celular ($mg.mL^{-1}$ - peso seco) X tempo (h)], a partir da qual foram determinados os intervalos e as concentrações celulares características das fases metabólicas de crescimento da levedura em meio YPD, necessários à coleta celular para a realização dos ensaios posteriores.

3.5. Consumo de Glicose em Condições Não-Proliferantes

A taxa de consumo de glicose foi avaliada por dosagem da glicose residual no meio por Cromatografia Líquida. As células foram crescidas até a fase metabólica adequada, coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada e ressuspenso em tampão fosfato 50 mM pH 6 a uma concentração celular final de 6 $mg.mL^{-1}$ (peso seco). A 5 mL da suspensão celular, foram adicionados 5 mL de solução de glicose 40 mM no mesmo tampão, perfazendo 10 mL de uma suspensão celular 3 $mg.mL^{-1}$ (peso seco) contendo 20 mM de glicose, em erlenmeyer de 50 mL.

Foi retirada uma alíquota de 1 mL imediatamente após a adição do tampão contendo glicose (ponto zero, 0 min), que foi centrifugada imediatamente a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi devidamente filtrado para condições cromatográficas e armazenado para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O meio foi incubado a 28º C e 160 rpm e alíquotas de 1 mL foram coletadas ao longo do tempo nos pontos referentes a 20 min, 40 min, 60 min e 80 min, procedendo-se da mesma maneira que no ponto zero para o tratamento da

amostra, centrifugando-se o meio e armazenando o sobrenadante após a filtração para posterior análise por CLAE. A glicose residual no sobrenadante foi analisada utilizando-se um sistema de CLAE equipado com um detector de índice de refração RI- 2031 Plus, JASCO, Japão. A glicose foi quantificada em uma coluna Aminex HPX-87H (7.8 mm I.D. × 30 cm, BioRad, EUA), com a temperatura de 60°C utilizando 0,004 mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4) como eluente a um fluxo igual a 0,6 mL por minuto. Uma vez determinada a concentração de glicose residual no sobrenadante em cada uma das alíquotas coletadas ao longo do tempo, foi feita uma curva de ajuste cujo coeficiente angular corresponde à taxa de consumo de glicose ($g.L^{-1}.min^{-1}$) da cepa em estudo.

3.6. Consumo de Oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio foi avaliada medindo-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido em suspensão celular ao longo do tempo, utilizando eletrodo de Clark. As células foram crescidas até a fase metabólica adequada coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O *pellet* foi lavado duas vezes e resuspenso em água destilada a uma concentração celular de 1 mg. μL^{-1} (peso úmido). 50 µL da suspensão celular (peso úmido de 50 mg célula) foram adicionados a 2 mL de solução de glicose 100 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7 em uma câmara de consumo de oxigênio com agitação contínua, perfazendo uma suspensão celular final na câmara de concentração 25 $mg.mL^{-1}$ (peso úmido). O consumo de oxigênio foi medido ao longo do tempo em oxígrafo por um eletrodo do tipo Clark, utilizando calibração em fase líquida (água saturada com oxigênio: 100%; depleção do oxigênio disponível na câmara pela adição de ditionito de sódio: 0%). A concentração de oxigênio na câmara foi medida durante um período aproximado de 5 min e a taxa de consumo de oxigênio ($nmol.mL^{-1}.min^{-1}$) foi obtida a partir do coeficiente angular da curva de ajuste.

No caso da avaliação do consumo de oxigênio na presença dos inibidores respiratórios, o volume da suspensão celular (50 µL) foi previamente tratado com o respectivo inibidor (cianeto ou antimicina) em microtubo, vortexando a suspensão e mantendo-a em repouso por 1 min, antes de sua transferência para a câmara de consumo de oxigênio. Após tratamento, a suspensão celular contendo o inibidor foi transferida para a câmara nas mesmas condições experimentais, de modo que a

concentração celular final na câmara fosse de 25 $mg.mL^{-1}$ (peso úmido) e perfazendo uma concentração específica de inibidor na câmara. A porcentagem de inibição respiratória foi avaliada por comparação entre a taxa de consumo de oxigênio na presença do inibidor e na ausência do mesmo.

3.7. Oxidação Intracelular

O nível de oxidação intracelular foi medido por fluorescência via reação da sonda 2'7'-diclorofluoresceína diacetato ($DCFH_2$-DA) com espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares. De modo geral, a sonda não-fluorescente lipofílica $DFCH_2$-DA se difunde e atravessa a membrana celular, sendo deacetilada na presença de esterases intracelulares formando 2'7'-diclorodi-hidrofluoresceína $DCFH_2$, que também não é fluorescente, mas se torna impermeável à membrana ($DFCH_2$) plasmática. $DFCH_2$ reage com EROs presentes no meio intracelular para formar 2'7'-diclorofluoresceína (DFC), fluorescente [81].

As cepas foram crescidas até a fase metabólica desejada, sendo coletadas 60 mg de células que foram lavadas duas vezes com água destilada e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min entre as lavagens. As células foram ressuspensas em 100 mL de água destilada em erlenmeyer, de modo que a concentração da suspensão fosse de 0,6 $mg.mL^{-1}$. À suspensão, adicionou-se um volume da solução alcoólica estoque recém-preparada de $DFCH_2$-DA (50 mM), de modo que a concentração final da sonda no meio fosse de 10 µM. A suspensão foi incubada por 30 min sob agitação a 28°C e 160 rpm.

Coletou-se um volume equivalente a 50 mg de células da suspensão (aproximadamente 83 mL), centrifugando a 5000 rpm por 5 min, e lavando as células duas vezes com água destilada para retirada da sonda não absorvida. O *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de água em tubo falcon de 15 mL, adicionando-se em seguida 1,5 g de pérolas de vidro. As células foram rompidas pela realização de três ciclos de agitação violenta em vórtex por 1 min, intercalados por 1 min no gelo. O lisado foi coletado em microtubo e as pérolas lavadas com 400 µL de água, coletando-se o volume de lavagem no mesmo microtubo. O extrato foi centrifugado a 13000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi coletado e diluído 6 vezes em água Milli-Q para leitura da fluorescência. A fluorescência foi avaliada em fluorímetro de placa, utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 504 nm e um comprimento

de onda de leitura de 524 nm e os resultados expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU).

3.8. Peroxidação Lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo método TBARS (*Tiobarbithuric Acid Reactive Substances*) [82] pela dosagem espectrofotométrica do malondialdeído, um dos produtos da peroxidação de lipídeos de membrana. Cerca de 50 mg de célula foram coletadas e lavados duas vezes com água destilada gelada. Após as lavagens, as células foram ressuspensas a 5 mL com água. Uma alíquota de 100 µL da suspensão foi retirada, avolumada a 10 mL com água realizando-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm (Abs_{570} nm). A suspensão inicial foi centrifugada, as células foram coletadas e ressuspensas com 500 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v) (TCA) em tubo falcon de 15 mL, adicionando-se em seguida 1,5 g de pérolas de vidro. As células foram rompidas pela realização de seis ciclos de agitação violenta em vórtex por 20 s, intercalados com 20 s no gelo. O lisado foi coletado em microtubo e as pérolas foram lavadas com 500 µL de TCA, coletando-se o volume de lavagem no mesmo microtubo. O extrato foi centrifugado a 13000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi coletado para análise.

O método TBARS se baseia na reação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais formados a partir da oxidação dos lipídios da membrana plasmática, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando uma base de Schiff colorida cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria. O ensaio foi feito com 150 µL do extrato, 150 µL de água destilada, 100 µL de EDTA 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v) em NaOH 0,05 M. A mistura reacional foi incubada em microtubo a 100ºC por 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a absorbância do meio foi determinada por leitura espectrofotométrica a 532 nm, utilizando-se como branco de leitura a mistura reacional submetida ao mesmo tratamento sem adição do extrato. Cada amostra foi feita em triplicata e os resultados padronizados em função da massa de células. Os resultados de peroxidação lipídica foram expressos em pmoles de malondialdeído por miligrama de célula em peso seco (pmoles $MDA.mg^{-1}$)

3.9. Avaliação de células respiratório-deficientes (*petites*)

As cepas foram crescidas até a fase metabólica desejada e a porcentagem de células respiratório-deficientes (*petites*) foi avaliada por plaqueamento em meio sólido contendo como fonte de carbono glicose (YPD), fonte de carbono fermentável, ou glicerol (YPGly), fonte de carbono metabolizada pela via respiratória. Uma alíquota correspondente a 40 µg de células foi coletada dos inóculos e avolumada a 1 mL em água estéril. A partir desta suspensão foram realizadas diluições sucessivas (1:100 e 1:10, em sequência) até suspensão final de 0,04 $\mu g.mL^{-1}$, a partir da qual foram plaqueados 100 µL (4 ng de células) em meio sólido YPD e YPGly, ambos em triplicata. As placas foram incubadas a 28ºC por 72 h e o número de colônias foi contado. A porcentagem de células respiratório-deficientes (*petites*) foi determinada por comparação do número de colônias crescidas em cada meio.

3.10. Ensaio de Competição

As cepas WT e mutante foram pré-inoculadas por alçada em 5 mL de meio YPD líquido *overnight* e, então, reinoculadas em meio YPGly juntas no mesmo inóculo na concentração celular de 0,25 $mg.mL^{-1}$ cada, totalizando 0,5 $mg.mL^{-1}$ de células no meio de crescimento.

A porcentagem populacional das cepas ao longo do tempo foi avaliada por plaqueamento de alíquota do meio de crescimento em meio sólido YPD, no qual crescem tanto a cepa WT quanto a mutante, e meio sólido seletivo YPD contendo 200 $mg.L^{-1}$ de geneticina, no qual cresce apenas a cepa mutante.

Uma alíquota correspondente a 40 µg de células foi coletada dos inóculos e avolumada a 1 mL em água estéril. A partir desta suspensão foram realizadas diluições sucessivas (1:100 e 1:10, em sequência) até suspensão final de 0,04 $\mu g.mL^{-1}$, a partir da qual foram plaqueados 100 µL (4 ng de células) em meio sólido YPD e YPD contendo geneticina, ambos em triplicata. As placas foram incubadas a 28ºC por 72 h e o número de colônias foi contado. A porcentagem de células da cepa mutante (*rtg2Δ*) foi determinada por comparação do número de colônias crescidas em YPD ou YPD contendo geneticina. Para avaliação da porcentagem populacional de células respiratório-deficientes ao longo do crescimento, o plaqueamento também foi feito em meio YPGly sólido.

3.11. Atividade Enzimática de Aconitase

Foram coletados 50 mg de células, que foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes com água destilada gelada. As células foram ressuspensas em 500 µL de tampão fosfato 50 $mmol.L^{-1}$ pH 7,8 e transferidas para um tubo falcon de 15 mL contendo 1,5 g de pérolas de vidro. O extrato celular foi obtido pela realização de 3 ciclos de agitação violenta em vórtex por 1 minuto, intercalando por 1 minuto no gelo. O lisado foi coletado para um microtubo e as pérolas lavadas com 500 µL de tampão, coletando-se no mesmo microtubo o referido volume. Após centrifugação do extrato a 13000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi coletado e reservado.

A determinação da concentração total de proteínas no extrato celular foi feita pelo método de Stickland [83], utilizando-se albumina bovina para construção de curva padrão e determinação do fator de conversão. Adicionou-se 100 µL do extrato celular a 4,9 mL de água, seguido de 900 µL de NaOH 20% (p/v) e 150 µL de $CuSO_4$ 25% (p/v). A mistura foi homogeneizada em vortex, centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante reservado para leitura da absorbância a 550 nm. A concentração de proteína total no extrato foi determinada utilizando-se o fator de conversão da curva padrão e a leitura de absorbância a 550 nm.

A atividade enzimática de aconitase foi determinada por reação acoplada entre conversão do citrato a isocitrato, catalisada pela aconitase presente no extrato celular, e conversão do isocitrato gerado na reação anterior a α-cetoglutarato, catalisada pela isocitrato desidrogenase dependente de NADPH. A curva de progresso de formação de NADPH foi acompanhada por leitura cinética espectrofotométrica a 340 nm, determinando-se a taxa de formação deste produto (K_{NADPH} = 6,22 $L.mmoL^{-1}$) .

Para leitura cinética adicionou-se em uma cubeta de quartzo: 700 µL de tampão de reação (citrato de sódio 7,14 $mmol.L^{-1}$ e $MnCl_2$ 0,857 $mmol.L^{-1}$ em tampão Tris-HCl 50 $mmol.L^{-1}$ pH 7,5), seguido de 80 µL de NADP 2,5 $mmol.L^{-1}$ e 20 µL de isocitrato desidrogenase 0,1 U. μL^{-1}, e a reação foi disparada pela dição de 200 µL de extrato celular. O branco de reação foi composto do tampão de reação. A curva de progresso foi acompanhada por 3 minutos, obtendo-se leituras a cada 10 segundos [84,85]. Os resultados foram expressos em unidades de atividade específica ($U.mg^{-1}$), no qual uma unidade de atividade específica de aconitase é definida como a produção de 1 µmol de $produto.min^{-1}.mg^{-1}$.

3.12. Adaptação em Cianeto / Antimicina

As cepas WT e *rtg2Δ* foram inoculadas a uma concentração celular de 1 $\mu g.mL^{-1}$ em meio YPD contendo 5 µM de KCN, e mantidas em crescimento por um período de 72 h. Uma alíquota de 5 µL da suspensão foi plaqueada em meio sólido YPD. Após 72 h de crescimento na placa, uma alçada das células foi ressuspensa em água estéril e, a partir desta suspensão, foi feito um novo inóculo a uma concentração celular de 1 $\mu g.mL^{-1}$ em meio YPD contendo 10 µM de CN^-, mantendo o crescimento por um período de 72 h. O mesmo protocolo foi realizado sucessivas vezes nas concentrações de 20 µM , 60 µM, 180 µM e 400 µM de CN^-. Após a última adaptação as cepas foram estocadas em meio sólido YPD.

Para a adaptação em antimicina, a cepa WT e *rtg2Δ* foram inoculadas a uma concentração celular de 1 $\mu g.mL^{-1}$ em meio YPD contendo 30 µM de Antimicina, e mantidas em crescimento por um período de 72 h. O mesmo procedimento de plaqueamento e ressuspensão da adaptação com cianeto foi realizado para os reinóculos seguintes, sendo feitas adaptações sequenciais a 100 µM por 96 h, seguida de 100 µM por 72 h. Após a última adaptação as cepas foram estocadas em meio sólido YPD.

3.13. Avaliação da Expressão Gênica

As cepas de controle WT ou mutante *rtg2Δ*, e suas respectivas derivadas adaptadas ao inibidor respiratório, foram crescidas em meio YPD até a segunda fase exponencial de crescimento (metabolismo respiratório). As células foram coletadas e a extração do RNA total foi realizada utilizando-se o kit Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, US), que se baseia na utilização de uma membrana de sílica com afinidade pelo RNA para purificação.

Coletou-se um volume equivalente a 3 OD.mL do inóculo em um microtubo, centrifugando a 13000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de liticase 50 U/mL (em tampão de diluição contendo sorbitol 1 mol.L, EDTA 0,1 mol.L pH 7,4 e 0,1 % (v/v) de β-marcaptoetanol) e incubado a 30ºC por 30 min para degradação da parede celular. Após isto, prosseguiu-se com o protocolo indicado pelo fabricante. De modo geral, após a degradação da parede celular, as células são lisadas com uma solução contendo isotiocianato de guanidida e β-mercaptoetanol (inativação de RNAses), seguido por centrifugação do lisado em

membrana de sílica, tratamento com DNAse I livre de RNAse na própria coluna e eluição do RNA total. O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica em equipamento Nanodrop ™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific) e a pureza da amostra foi qualificada pela análise das razões A260/A280 (avaliação de contaminação por proteínas) e A260/A230 (avaliação de contaminação por compostos orgânicos - guanidina, fenóis, sais caotrópicos e outros compostos aromáticos).

A transcrição reversa em cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total extraído utilizando-se o kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, US), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. A solução final de cDNA foi diluída 10 vezes em água ultrapura livre de DNAses e RNAses para realização da quantificação de expressão.

Para avaliação da expressão gênica utilizou-se a quantificação relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR). A expressão gênica foi avaliada utilizando-se o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, US), a partir de 50 ng de cDNA e 400 $nmol.L^{-1}$ de concentração final de cada *primer* no meio reacional, utilizando os ciclos de amplificação de acordo com as especificações do kit, utilizando uma temperatura de anelamento (T_m) de 58°C. Foi avaliada a expressão dos genes ACO1, POR1, CRD1, HXK2, RAS1, RAS2 e SCH9, utilizando-se ACT1 (actina) como controle endógeno [86]. Os *primers* foram desenvolvidos com o auxílio do software Primer3 [87] e estão especificados na Tabela 1. As reações em tempo real foram executadas e avaliadas no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, US). O programa de ciclagem inclui, em sequência, a ativação da enzima polimerase e desnaturação do DNA a 95°C por 30 s, seguida por 40 ciclos de 5 s de desnaturação a 95°C, e 15 s de anelamento e extensão a 60ºC, de acordo com o protocolo do kit utilizado, com a leitura da fluorescência (SYBR® Green). Posteriormente a curva de dissociação foi realizada através do aumento de 0,5°C a cada 2 s, partindo de 65°C e terminando a 95°C, para analisar o perfil dos produtos formados. Foi utilizado o método de Livak - $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) para a quantificação relativa a partir dos dados dos ciclos (Ct).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene	Tipo de *primer* *	Sequência do *primer*
ACT1	F	5’ AAACCGCTGCTCAATCTTCTTC 3’
	R	5’ GGGCTCTGAATCTTTCGTTACC 3’
ACO1	F	5’ GTTGACACCTTCTCCGCTAC 3’
	R	5’ CTTACCACGACCAGTTGCTTC 3’
POR1	F	5’ CGAGCAAATAACTACCGTTGAC 3’
	R	5’GTAAGCCAAAGTGACAATACCG 3’
CRD1	F	5’ TATGAGAAAGAAGAGGGCTGTGAA 3’
	R	5’ TATTGTGGTCGTGGCGGTTA 3’
HXK2	F	5’ GGACACTTCTTACCCAGCCA 3’
	R	5’ CAGCAATACCACAAACGGACAA 3’
RAS1	F	5’ GGACGACGGTGGGAAATACAA 3’
	R	5’ AACGGCTGACTTTGAACTGGA 3’
RAS2	F	5’ GTGGTGGTGGTGTTGGTAAATC 3’
	R	5’ CACTTGCTTCCTGTATGAATCCTC 3’
SCH9	F	5’ TCTTCGTCGGGTTCTTCAAATGGTC 3’
	R	5’ GGTCGTGGGCAGCATCATAAACAG 3’

* F: *forward primer* | R: *reverse primer*

3.14. Análise de Dados e Análise Estatística

Os resultados de todos os experimentos representam a média ± desvio padrão de no mínimo 3 experimentos independentes para cada condição e cepa testada. Os resultados foram analisados comparativamente utilizando o teste *t* de Student, com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). As marcações com asteriscos (*) representam resultados estatisticamente diferentes para um valor $p < 0,05$ dentro de cada condição ou cepa estudada.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobre compreensão:

"Se as portas da percepção estivessem limpas,
tudo apareceria ao homem tal como é: infinito"

- William Blake

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Metabólica

De modo a avaliar o comportamento metabólico e caracterizar o perfil bioenergético das cepas WT e *rtg2Δ*, foram realizados os experimentos de consumo de glicose e oxigênio das células íntegras em metabolismo fermentativo (sob repressão catabólica) ou respiratório. A taxa de consumo de glicose e oxigênio fornece um parâmetro indicativo do perfil bioenergético celular, visto que a produção de ATP intracelular depende principalmente de dois processos: fosforilação a nível de substrato ou fosforilação oxidativa.

Em repressão catabólica, a célula de *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza a glicose pela via fermentativa, mesmo em presença de oxigênio (efeito Crabtree). O consumo de oxigênio nesta fase metabólica é bastante baixo, uma vez que diversos genes requeridos para a constituição metabólica respiratória e da via oxidativa encontram-se reprimidos. Como o rendimento de ATP por molécula de glicose é bastante baixo em metabolismo fermentativo, visto que a obtenção de ATP ocorre pela via glicolítica (fosforilação a nível de substrato), ocorre um maior consumo de glicose para manter o nível energético adequado para a manutenção das funções celulares. Desta forma, em metabolismo fermentativo sob repressão catabólica, o parâmetro bioenergético mais adequado para avaliação fenotípica é a taxa de consumo de glicose da cepa. Já em metabolismo respiratório (metabolismo oxidativo), o rendimento de ATP por molécula de glicose é bem maior, pois o aproveitamento energético para síntese de ATP provém da respiração celular (cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa). O ATP exerce inibição sobre a fosfofrutoquinase 1 (Pfk1), o principal ponto de controle para regulação da via glicolítica. A inibição da Pfk1 pela elevada carga energética (ATP) gerada na respiração celular ocasiona uma redução no fluxo glicolítico e, consequentemente, do consumo de glicose pela célula. Desta forma, a célula necessita de menos glicose para manter o nível energético intracelular, em comparação ao metabolismo fermentativo. Uma vez que a via oxidativa está ativa e a taxa de consumo de glicose é baixa em metabolismo respiratório, o parâmetro fenotípico mais adequado para avaliação bioenergética neste caso é a taxa de consumo de oxigênio das cepas.

Durante o crescimento na primeira fase exponencial em glicose (YPD), condição na qual a célula se encontra sob repressão catabólica, a deleção de Rtg2p alterou a taxa de consumo do açúcar. A cepa *rtg2Δ* apresentou uma taxa de consumo de glicose em metabolismo fermentativo aproximadamente 25 % maior que a cepa controle (Figura 4). De modo semelhante, em metabolismo respiratório a cepa *rtg2Δ* apresentou uma taxa de consumo de oxigênio aproximadamente 36 % maior que a cepa controle (Figura 4). Para investigar se a alteração do perfil de consumo de oxigênio é causado pela perda de Rtg2p isoladamente ou pela perda de funcionalidade da via RTG, o mesmo experimento foi realizado em uma cepa mutante deletada no fator de transcrição Rtg3p. O mesmo fenótipo para a taxa de consumo de oxigênio foi observado para as mutantes (*rtg2Δ*, *rtg3Δ*) em relação à cepa WT, em metabolismo respiratório (YPD) (Figura 5).

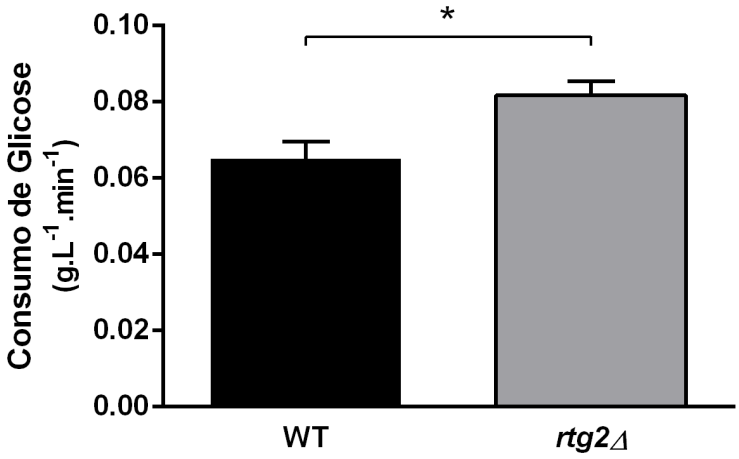

Figura 1. Taxa de Consumo de Glicose das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo fermentativo, sob repressão catabólica (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

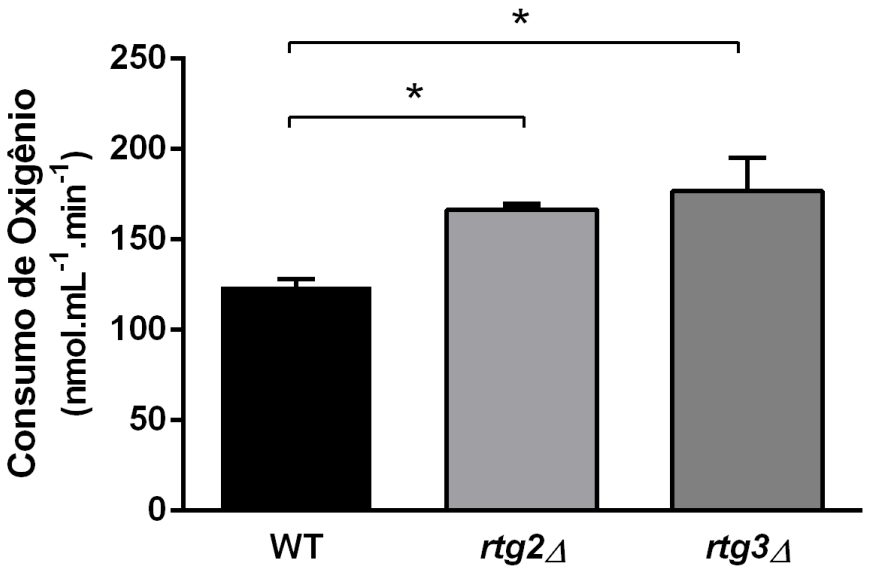

Figura 2. Taxa de Consumo de Oxigênio das cepas WT, *rtg2Δ* e *rtg3Δ* em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Tais resultados analisados em conjunto indicam que a presença da via RTG íntegra é fundamental para a regulação metabólica bioenergética celular, modulando o consumo de glicose em metabolismo fermentativo sob repressão catabólica, e o consumo de oxigênio em metabolismo respiratório. Uma vez que a proteína Rtg2p atua como um sensor de disfunção mitocondrial para ativação da resposta metabólica, pode-se afirmar que o status mitocondrial exerce um papel sobre a modulação metabólica celular, mantendo certa homeostase na regulação dos processos bioenergéticos.

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) da respiração celular é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs). Durante o transporte de elétrons para o aceptor final, o oxigênio molecular (O_2), ocorre a formação de intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio, como o ânion superóxido (O^{2-}) e o ânion peróxido (O_2^{2-}), a partir dos quais derivam o radical hidroxila (•OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tais espécies são altamente reativas e capazes de causar dano aos constituintes celulares, como DNA, lipídeos e proteínas. Uma vez que a cepa *rtg2Δ* apresenta uma maior taxa de consumo de oxigênio em metabolismo respiratório (YPD), buscou-se investigar se o nível de dano oxidativo intracelular seria maior nesta cepa.

Para avaliar o dano oxidativo intracelular basal, foram medidos dois parâmetros: oxidação intracelular (oxidação geral) e peroxidação lipídica (oxidação específica). O nível de oxidação intracelular foi medido através da sonda 2’7’-diclorofluoresceína diacetato (DCFH2-DA), uma molécula não-fluorescente e lipofílica que se difunde e atravessa a membrana celular. Uma vez no meio intracelular, a molécula é deacetilada na presença de esterases intracelulares formando 2’7’-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH2), que também não é fluorescente, mas se torna impermeável à membrana plasmática. DFCH2 reage com EROs presentes no meio intracelular para formar 2’7’-diclorofluoresceína (DFC), fluorescente [81]. O nível de peroxidação lipídica, um dos tipos de dano específico causados pelas EROs, foi avaliado pela determinação do malondialdeído, um dos produtos da peroxidação dos lipídeos de membrana.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no nível de oxidação intracelular basal ou dano de peroxidação lipídica entre a cepa mutante *rtg2Δ* e a cepa WT em metabolismo respiratório (YPD) (Figuras 6, 7).

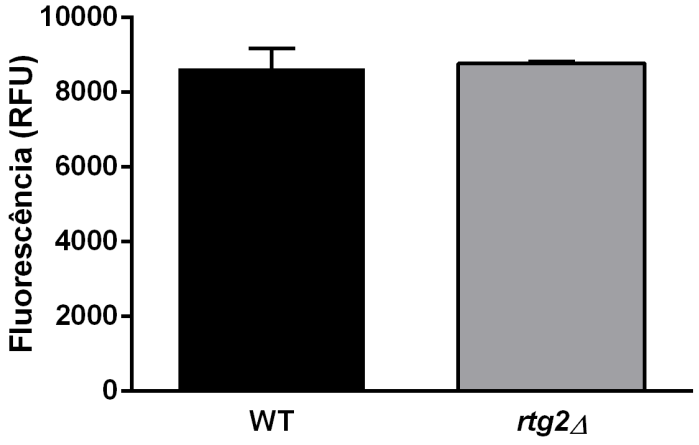

Figura 3. Oxidação intracelular das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD).

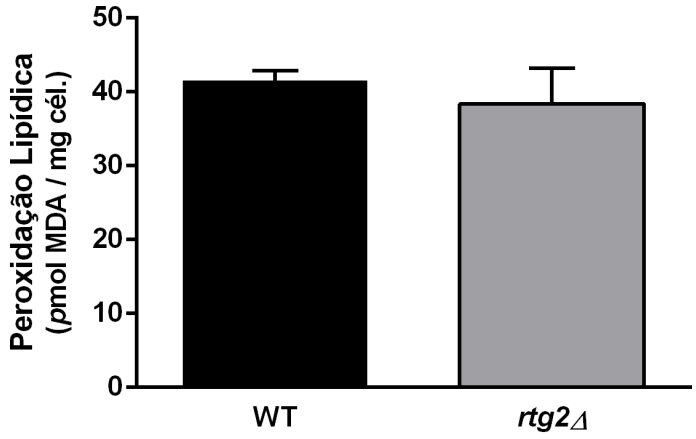

Figura 4. Peroxidação Lipídica das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD).

Desta forma, apesar do maior aporte de oxigênio na respiração, o que ocasionaria uma maior formação de EROs, a cepa mutante *rtg2Δ* é capaz de manter os níveis de dano oxidativo intracelular a níveis semelhantes aos da cepa WT. Apesar de apresentarem uma oxidação intracelular basal semelhante, já é reportado na literatura que a deleção de Rtg2p ocasiona a depleção de algumas defesas antioxidantes, como glutationa peroxidase (GPx), além de conferir menor resistência ao estresse com peróxido de hidrogênio [88].

Uma vez que se observa um aumento expressivo no consumo de oxigênio em metabolismo respiratório para a cepa deletada em Rtg2p, buscou-se avaliar as razões pelas quais tal fenótipo é observado. De modo a verificar qualitativamente o conteúdo mitocondrial em metabolismo respiratório nas condições metabólicas em estudo, mediu-se a taxa de consumo de oxigênio das cepas na presença dos inibidores respiratórios cianeto e antimicina.

O cianeto (CN^-) é um inibidor da cadeia respiratória que atua sobre o complexo IV, inibindo a citocromo c oxidase (COX), enzima responsável pela redução do oxigênio molecular, reação que ocorre no centro catalítico binuclear cyt a_3-Cu_B, associada à oxidação do citocromo c. O cianeto se liga ao centro binuclear inibindo o processo redox [89] e, consequentemente, a respiração celular. Já a antimicina é um inibidor respiratório que atua sobre o complexo III (Q-citocromo *c* oxidoredutase) da cadeia transportadora de elétrons. O complexo III apresenta dois centros redox: centro Qi, localizado na membrana mitocondrial interna exposto à

matriz mitocondrial, e o centro Qo, localizado no espaço intermembranar [90]. A antimicina desestabiliza a ubisemiquinona no sítio Qi, impedindo a transferência de elétrons do citocromo b_H para o sítio Qi. Desta forma, o citocromo b_H não consegue ser reoxidado na presença de antimicina, causando uma interrupção no fluxo de elétrons na cadeia transportadora e, consequentemente, a inibição da respiração celular.

Em metabolismo respiratório, a inibição da taxa respiratória da cepa *rtg2Δ* pelo cianeto foi aproximadamente seis vezes menor em relação à cepa controle em 0,75 μM de CN^- (Figura 8A). De modo semelhante, a inibição respiratória pelo tratamento com antimicina foi aproximadamente três vezes menor na cepa mutante em relação à cepa controle em 0,075 μM de antimicina (Figura 8B). Tais resultados indicam que a maior capacidade respiratória observada para a cepa mutante *rtg2Δ* ocorre devido a uma alteração da qualidade (maior expressão dos complexos respiratórios) e/ou quantidade mitocondrial (maior número de mitocôndrias). Em concentrações elevadas do inibidor, ocorre a saturação dos sítios de inibição e, portanto, as diferenças da taxa de inibição respiratória entre as cepas WT e *rtg2Δ* se torna menos pronunciada. Em metabolismo respiratório em condição de escassez nutricional durante o crescimento em YPD (7 dias de crescimento), a cepa *rtg2Δ* é reportada como apresentando uma maior atividade da enzima citrato sintase e uma maior expressão de VDAC (Western Blot) indicando um maior conteúdo mitocondrial [91]. A partir dos dados obtidos de inibição respiratória, acredita-se que também ocorra um aumento no conteúdo mitocondrial nas condições experimentais testadas no presente estudo (crescimento em meio YPD por 48 horas).

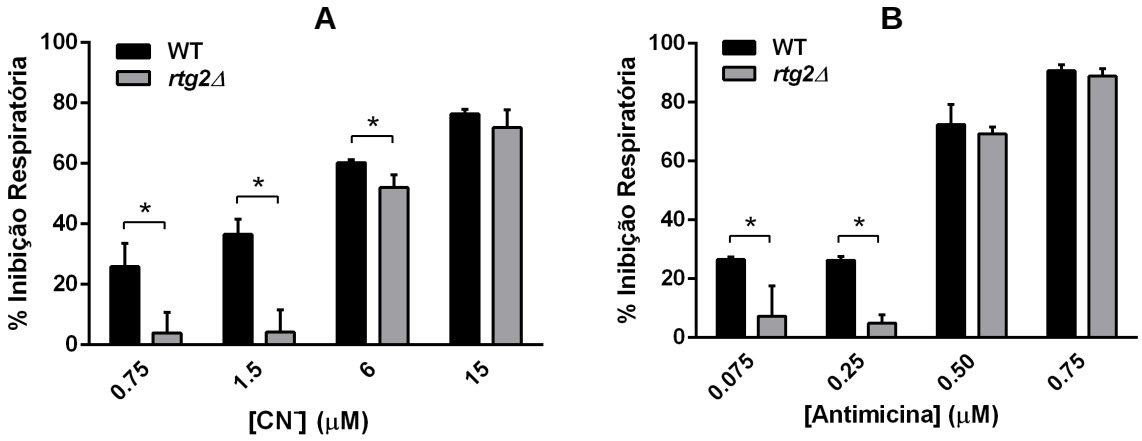

Figura 5. Perfil de inibição respiratória das cepas WT e *rtg2Δ* na presença dos inibidores respiratórios (A) cianeto e (B) antimicina, em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

O mesmo experimento foi realizado utilizando-se uma cepa mutante deletada no fator de transcrição Rtg3p (*rtg3Δ*) e o mesmo perfil de inibição foi observado (Figura 9), indicando que a alteração no perfil e/ou conteúdo mitocondrial é característica da perda de funcionalidade da via RTG. Desta forma, a via de sinalização retrógrada é necessária não apenas para a resposta de adaptação metabólica ao dano respiratório, como também para controle de processos de regulação do conteúdo / perfil mitocondrial. A dinâmica deste processo dependente da via RTG ainda não é evidenciada na literatura, dentro de nosso conhecimento, mas sugere-se que tenha relação com os processos de mitofagia [91], que são fundamentais para a manutenção de um *pool* mitocondrial funcional e para evitar acúmulo de defeitos mutacionais no mtDNA [92].

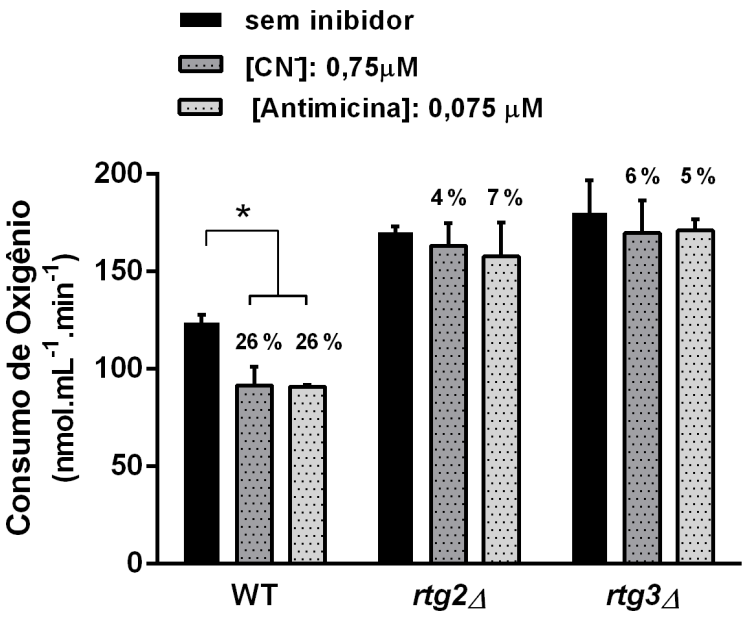

Figura 6. Perfil de inibição respiratória comparativo entre as cepas WT, *rtg2Δ* e *rtg3Δ* na presença dos inibidores respiratórios cianeto e antimicina, em metabolismo respiratório (YPD). Os valores sobre as barras indicam a porcentagem de inibição da taxa de consumo de oxigênio após o tratamento com o respectivo inibidor respiratório. (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Um ensaio comparativo (RT-qPCR) foi realizado em metabolismo respiratório (YPD) para verificar se o perfil fenotípico de maior quantidade mitocondrial observado para a cepa mutante deletada em Rtg2p pode ser corroborado geneticamente via análise de expressão gênica. Para isto, avaliou-se a expressão de POR1, que codifica uma porina mitocondrial do tipo VDAC (*voltage-dependent anion channel*), requerida para a manutenção da estabilidade osmótica e permeabilidade da membrana mitocondrial; e de *ACO1*, gene que codifica a enzima aconitase, enzima associada principalmente ao CAC. Vale ressaltar que a expressão de *ACO1* é positivamente regulada tanto pelo complexo de transcrição Hap2-5p, do sistema HAP, quanto pelos fatores de transcrição Rtg1p e Rtg3p, da via RTG. Em condição de repressão catabólica a expressão de *ACO1* é regulada principalmente pela via RTG, visto que a expressão do complexo transcricional Hap é reprimida em crescimento em glicose. Conforme a célula atinge o *shift* diáuxico, ocorre a desrepressão dos componentes do sistema de complexos Hap (especificamente o complexo Hap1p, um ativador transcricional, e o complexo heterodimérico Hap2-5p), que passam a controlar a expressão de genes que codificam diversos elementos do

metabolismo respiratório, incluindo *ACO1* [93]. Desta forma, *ACO1* tem sua expressão regulada por dois sistemas distintos: a via RTG, em condição de repressão catabólica ou em células com capacidade respiratória reduzida ou eliminada, ou o sistema HAP, em células com capacidade respiratória e função mitocondrial robusta, em metabolismo respiratório.

Pelos dados de RT-qPCR, a deleção de Rtg2p ocasionou um aumento de 37 % na expressão de POR1 e 33 % na expressão do gene *ACO1* (Figura 10, Tabela 2), corroborando aos dados fenotípicos que indicam um aumento da quantidade mitocondrial na cepa mutante *rtg2Δ*. Desta forma, os resultados em conjunto sugerem que a presença de Rtg2p é importante para a manutenção e regulação do conteúdo mitocondrial.

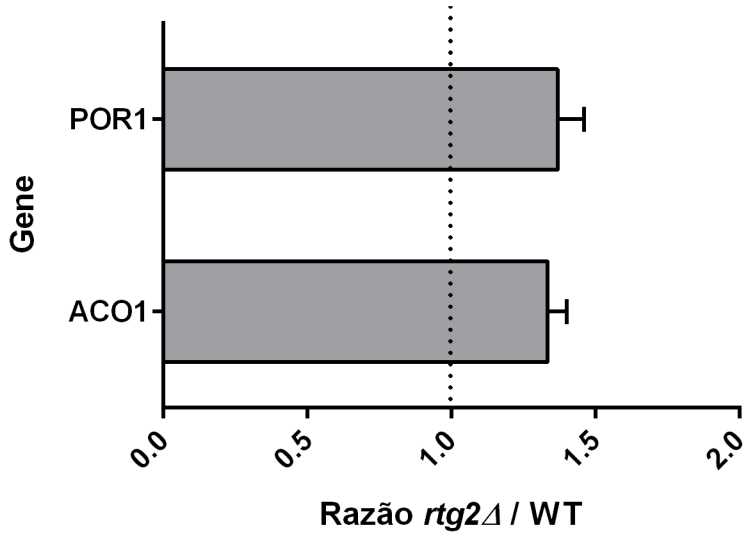

Figura 7. Expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se ACT1 como gene de referência.

Tabela 1. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se ACT1 como gene de referência.

Expressão Gênica Relativa *rtg2Δ* / WT	
Gene	**Vezes de Aumento (média ± DP)**
ACO1	1,33 ± 0,07
POR1	1,37 ± 0,09

De modo a caracterizar de forma mais ampla o perfil metabólico em metabolismo respiratório, mediu-se a atividade da enzima aconitase, com o objetivo de verificar se o aumento na expressão gênica, neste caso, estava associado a um aumento da atividade enzimática. A aconitase é uma enzima que catalisa a interconversão reversível do citrato em isocitrato, via um intermediário de cis-aconitato. A enzima contém um cluster [4Fe-4S], que interage diretamente com o substrato, e é um dos sensores de estresse oxidativo mitocondrial. A aconitase existe tanto na matriz mitocondrial quanto no citosol, participando de duas vias metabólicas distintas: o ciclo do ácido cítrico (mitocôndria) e o ciclo do glioxilato (citosol). A aconitase mitocondrial (mAcn) não é capaz de substituir a citosólica (cAcn) em termos funcionais e vice-versa, ainda que suas atividades enzimáticas sejam indistinguíveis. A mAcn está presente em maior quantidade na célula, eclipsando a atividade a enzimática da cAcn em ensaios enzimáticos [58]. Além disso, a mAcn exerce a função de manutenção do mtDNA, ligando-se diretamente ao mtDNA de modo independente de sua atividade catalítica, de modo que a deleção de ACO1 causa a perda da capacidade respiratória celular e a formação de uma população de células respiratório-deficientes (*petites*) [94].

A cepa mutante *rtg2Δ* apresentou um aumento de aproximadamente 16 % na atividade enzimática de aconitase em relação à cepa selvagem em metabolismo respiratório (Figura 11), condição em que a expressão de ACO1 é regulada por HAP. Como a mAcn está presente em maior quantidade na célula, principalmente em metabolismo respiratório, a maior atividade de aconitase observada para a cepa mutante pode ser atribuída majoritariamente à aconitase mitocondrial. Desta forma,

um aumento da atividade enzimática de aconitase está de acordo com a presença de um maior conteúdo mitocondrial na cepa *rtg2Δ*, corroborando os resultados de expressão gênica e inibição respiratória obtidos anteriormente.

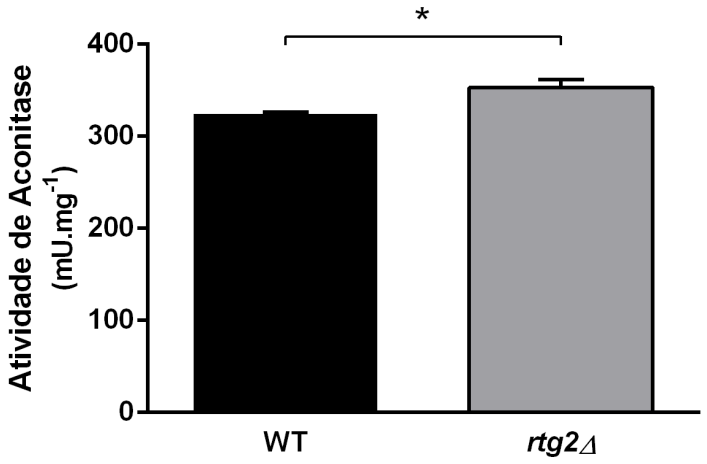

Figura 8. Atividade de aconitase das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD). (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Uma vez que a cepa mutante *rtg2Δ* apresenta maior quantidade mitocondrial em metabolismo respiratório (YPD), buscou-se avaliar parâmetros fenotípicos que pudessem ser relacionados à qualidade mitocondrial. Para isto, as cepas foram cultivadas inicialmente em glicose (YPD) até atingirem a fase de metabolismo respiratório, e plaqueadas em meio sólido contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono. O glicerol é uma fonte de carbono unicamente metabolizada pela via oxidativa. Desta forma, se há algum tipo de dano funcional à mitocôndria e, consequentemente, à capacidade respiratória celular, a célula não é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono para seus processos bioquímicos e, portanto, classificada como respiratório-deficiente (*petite*). Uma subpopulação *petite* não é capaz de utilizar de maneira eficiente fontes de carbono não-fermentáveis, por apresentarem defeitos que as impedem de utilizar a via oxidativa para obtenção de ATP.

A cepa mutante *rtg2Δ* apresentou uma taxa populacional de células respiratório-deficientes (*petites*) de aproximadamente 15 %, enquanto que toda a população da cepa WT se mostrou respiratório-competente (Figura 12). Tal resultado pode se apresentar como uma aparente inconsistência, visto que a cepa

mutante apresenta uma maior taxa de consumo de oxigênio e quantidade mitocondrial, o que indica, portanto, uma maior capacidade respiratória. No entanto, tais fenótipos representam uma característica média populacional, não correspondendo, portanto, ao perfil fenotípico individual de subpopulações. A formação de uma subpopulação *petite* indica que a deleção de Rtg2p, apesar de ocasionar um aumento no conteúdo mitocondrial na cepa mutante, o faz às custas da geração de uma subpopulação respiratório-deficiente, que apresenta algum tipo de disfunção mitocondrial e, portanto, é incapaz de metabolizar fontes não-fermentáveis de carbono. Sendo assim, a integridade de Rtg2p é necessária à manutenção da quantidade e da qualidade mitocondrial, mantendo uma dinâmica de recuperação funcional adequada.

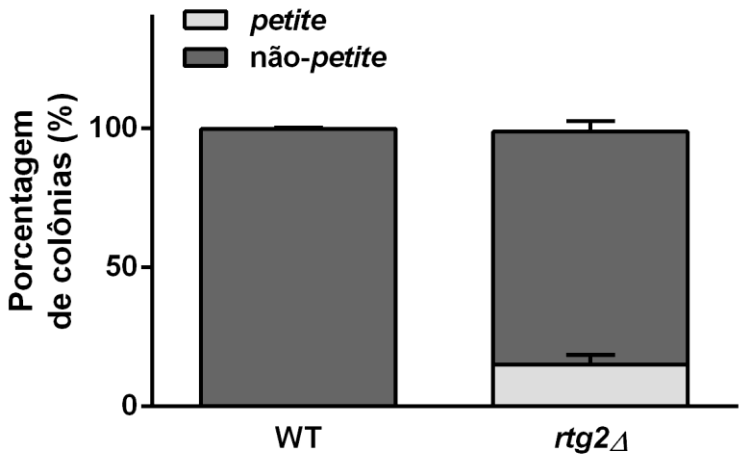

Figura 9. Porcentagem populacional de colônias respiratório-deficientes (petites) e respiratório-competentes (não-petites) das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD).

Uma vez que a via RTG é uma via que compõe o sistema de *mitocheckpoint* celular, ela atua junto a outras vias para evitar a produção de células com mitocôndrias disfuncionais. O papel exercido pela via RTG no sistema de *mitocheckpoint* é o de adaptar o metabolismo celular para obtenção de intermediários de biossíntese mesmo na presença de uma disfunção respiratória, principalmente no CAC. Este ajuste metabólico é uma resposta transiente para manter a viabilidade metabólica até que a funcionalidade mitocondrial seja recuperada. Uma vez que a deleção de Rtg2p ocasionou a formação de uma subpopulação respiratório-deficiente (aproximadamente 15 %), mas não como um

fenótipo populacional geral, sugere-se que isto ocorra pelo fato de que a via RTG atua como auxiliadora do processo de recuperação mitocondrial, não atuando diretamente neste processo, mas sim ajustando o metabolismo celular até que o dano seja reparado. Desta forma, a recuperação da funcionalidade mitocondrial é dificultada pela deleção de Rtg2p (perda da integridade da via RTG), mas não depende unicamente desta via, estando de acordo com a função exercida pelo sistema de *mitocheckpoint* [60].

Para investigar se a alteração do perfil mitocondrial observada pela perda da via RTG durante o metabolismo respiratório depende da fonte de carbono metabolizada, mediu-se a taxa de consumo de oxigênio em meio contendo glicerol (YPGly), uma fonte de carbono não repressora e não fermentável, passível apenas de metabolismo pela via respiratória. A cepa WT apresentou a mesma taxa de consumo de oxigênio em metabolismo respiratório, independentemente da fonte de carbono metabolizada pela via oxidativa (glicose, coletada na 2ª fase exponencial de crescimento - YPD ou glicerol - YPGly). Já a cepa *rtg2Δ* apresentou uma taxa de consumo de oxigênio igual a da cepa WT na presença de glicerol como fonte de carbono (YPGly) (Figura 13). Ou seja, o fenótipo de maior consumo de oxigênio em relação à cepa WT só ocorre quando a fonte de carbono metabolizada é a glicose (YPD). Portanto, o tipo de fonte de carbono metabolizada exerce um efeito sobre a modulação do perfil mitocondrial mediado pela via RTG.

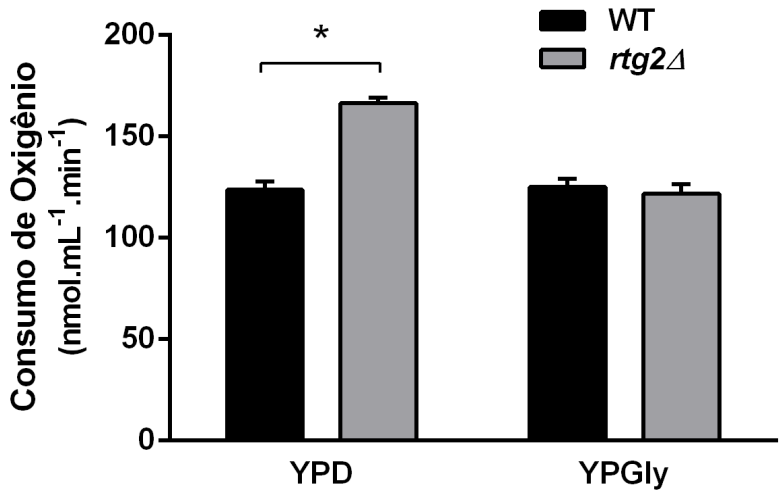

Figura 10. Taxa de Consumo de oxigênio das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório no meio YPD ou YPGly. (*) resultados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Para avaliar o papel da via RTG sobre o aproveitamento de uma fonte de carbono não-fermentável (glicerol), foi realizado um ensaio de competição entre as cepas. As cepas WT e mutante foram inoculadas à mesma concentração celular em meio YPGly, e a porcentagem de células WT ou mutantes foi avaliada ao longo do tempo de crescimento por plaqueamento em meio seletivo.

Durante o crescimento em meio contendo glicerol como fonte de carbono (YPGly), verificou-se uma maior adaptabilidade da cepa WT, cuja porcentagem total no meio, inicialmente de 50 %, aumentou para 65 % após 2 dias de crescimento, chegando a 80 % em 6 dias de crescimento (Figura 14). Tais resultados indicam que a perda de funcionalidade da via RTG pela deleção de Rtg2p afeta a capacidade de adaptação ao meio contendo uma fonte de carbono não-fermentável (glicerol), ou seja, metabolizada apenas pela via respiratória (oxidativa). Esta dificuldade adaptativa de crescimento da cepa mutante em meio cuja fonte de carbono é unicamente respiratória indica que existe, possivelmente, algum tipo de disfunção na metabolização de fontes de carbono pela via oxidativa na cepa deletada em Rtg2p. Tal resultado reafirma a importância da via RTG para a manutenção da dinâmica metabólica necessária ao processamento pela via respiratória e da funcionalidade mitocondrial.

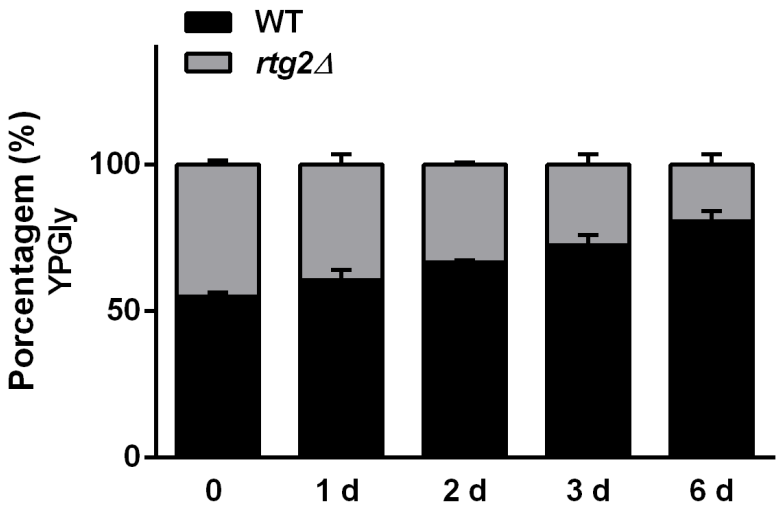

Figura 11. Porcentagem populacional das cepas WT e *rtg2Δ* ao longo do tempo durante o ensaio de competição em meio YPGly.

De modo a avaliar a qualidade mitocondrial ao longo do ensaio de competição, a taxa total de *petites* no meio de crescimento foi acompanhada pela metodologia anteriormente citada, plaqueando-se as células em meio YPD ou YPGly. Verificou-se uma quase total supressão do fenótipo *petite* após um dia de crescimento em YPGly (Figura 15). Uma vez que o glicerol é uma fonte de carbono não-fermentável, requer o desenvolvimento de um sistema respiratório íntegro e eficiente. Desta forma, subpopulações que não apresentam um perfil mitocondrial bem desenvolvido para metabolização da fonte de carbono pela via oxidativa são progressivamente suprimidas do meio de crescimento. Visto que a cepa mutante *rtg2Δ* já apresenta uma disfunção na dinâmica mitocondrial com a geração de subpopulações respiratório-deficientes, conforme indicado pelos resultados anteriores, é intuitivo esperar que a cepa mutante apresentasse uma dificuldade de desenvolvimento em meio contendo glicerol como a única fonte de carbono.

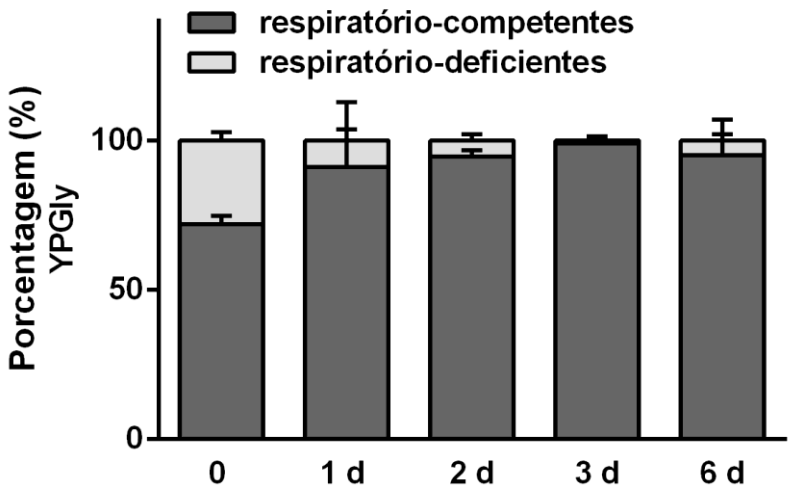

Figura 12. Porcentagem populacional de colônias respiratório-competentes (não-petites) e respiratório-deficientes (petites) durante o ensaio de competição realizado entre as cepas WT e *rtg2Δ*, durante crescimento em YPGly.

Se existe uma dificuldade da cepa mutante *rtg2Δ* em metabolizar uma fonte de carbono pela via respiratória, conforme evidenciado pelos ensaios de competição, como explicar o fato de a cepa mutante apresentar a mesma taxa de consumo de oxigênio que a cepa WT em YPGly? Parece haver um efeito de modulação da taxa de consumo de oxigênio no crescimento em YPGly que não se observa em YPD. Em meio contendo glicerol como fonte de carbono, ocorre a

seleção populacional apenas de células que foram capazes de manter uma estrutura e dinâmica mitocondrial funcional adequada, conforme evidenciado pelo acompanhamento da taxa de *petites*. A presença de um sistema respiratório funcional é uma exigência metabólica desde o início do crescimento em glicerol, visto que esta fonte de carbono só é metabolizada pela via oxidativa, daí a mutante *rtg2Δ* apresentar a mesma taxa de consumo de oxigênio que a cepa WT.

Já durante o crescimento em glicose (YPD), inicialmente ocorre a metabolização da glicose presente no meio, durante a primeira fase exponencial de crescimento, sob repressão catabólica. Neste momento, tanto subpopulações respiratório-competentes quanto respiratório-deficientes são capazes de metabolizar a glicose, que é uma fonte de carbono passível de metabolização pela via fermentativa. Após a exaustão da glicose do meio, ocorre a diauxia e início da metabolização do etanol, gerado após a fermentação, pela via oxidativa. Como as células respiratório-deficientes da cepa mutante não são capazes de metabolizar o etanol, por apresentarem mitocôndrias disfuncionais, param de se replicar e apenas a população respiratório-competente prossegue no *shift* diáuxico. No entanto, o processamento metabólico do etanol após a diauxia (YPD) ocasiona uma alteração do perfil mitocondrial, conforme evidenciado pelos experimentos anteriores, o que não é observado na metabolização do glicerol (YPGly), daí a mesma taxa de consumo de oxigênio. Isto pode ser explicado pela exigência metabólica do meio YPGly, que seleciona desde o início do crescimento apenas as células capazes de atender um determinado desenvolvimento mitocondrial.

4.2. Transformação Metabólica

A resposta retrógrada é responsável pela remodelação metabólica celular em condição de disfunção mitocondrial, ativando reações anapleróticas de modo a garantir que a célula obtenha intermediários de biossíntese mesmo na presença de um CAC truncado ou de um dano respiratório. Inicialmente a resposta retrógrada mitocôndria-núcleo é expressa de modo transiente para manter a célula em condição de viabilidade metabólica até que outras vias paralelas sejam mobilizadas e capazes de recuperar a funcionalidade da mitocôndria. Em uma condição em que o dano mitocondrial é sustentado e permanente e incapaz de ser ajustado, a via retrógrada, inicialmente ativada como uma resposta transiente, passa a modular de

maneira significativa o metabolismo [132,67]. Tal modulação metabólica persistente gerada pela via retrógrada, associada com a resposta de outras vias à disfunção mitocondrial, culmina com uma remodelação adaptativa do padrão de expressão gênica [35], causando instabilidade genômica, um desvio metabólico progressivo para a obtenção de ATP por fosforilação a nível de substrato, expressão de fatores de hipóxia e diversas outras alterações de sinalização. Em uma célula humana, este processo culmina com a transformação metabólica responsável pelo fenótipo tumoral [9].

Os experimentos de adaptação realizados em *Saccharomyces cerevisiae* tinham como objetivo investigar o perfil de expressão de genes específicos associados à transformação metabólica após a célula ser submetida a um dano respiratório lento e sustentado, o que impediria a célula de recuperar totalmente a funcionalidade mitocondrial e, portanto, manteria a via retrógrada ativa de modo persistente. Se a persistência da resposta metabólica modulada pela via retrógrada em mamíferos é capaz de tornar uma célula humana saudável em tumoral de modo irreversível [8,9], será que um processo análogo pode ser desencadeado na levedura, que apresenta uma resposta retrógrada semelhante (RTG)? Caso seja possível, poderia a levedura ser utilizada como um modelo não apenas para a investigação de fenótipos associados ao câncer, como também para processos dinâmicos de transformação metabólica relacionados ao desenvolvimento tumoral?

Para investigar tais questionamentos, buscou-se inicialmente estabelecer o papel desempenhado por Rtg2p e, consequentemente, da via RTG, na expressão de genes associados à transformação metabólica na levedura, de modo semelhante à transformação maligna tumoral. Para isto, foram selecionados genes (homólogos ou não-homólogos a genes humanos) análogos a três grupos distintos de alterações observadas em células tumorais humanas: (I) genes associados à alteração de dinâmica mitocondrial; (II) genes associados à remodelação bioenergética; e (III) genes associados à desregulação de crescimento e proliferação. Estes três grupos representam alterações frequentemente observadas em células tumorais.

Quanto ao primeiro grupo, alterações na dinâmica mitocondrial são frequentemente reportadas tumores [95]. Uma característica marcante presente em diversos tipos de tumores é a alteração do conteúdo lipídico da membrana mitocondrial, mais especificamente de cardiolipina, um fosfolipídeo aniônico característico da mitocôndria, predominantemente presente na membrana

mitocondrial interna [96], compondo aproximadamente 15-20 % dos fosfolipídeos mitocondriais das células eucarióticas [97,98]. Além de ser fundamental para a manutenção de importantes funções mitocondriais, como transporte de biomoléculas e apoptose mediada pela mitocôndria, a cardiolipina mantém a integridade funcional e estrutural dos complexos da fosforilação oxidativa. Em levedura, por exemplo, a cardiolipina é parte integral da estrutura dos complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons [99]. Em células tumorais, defeitos na síntese e remodelação do conteúdo de cardiolipina foram associados com anormalidades na CTE [100] e com aumento da proliferação de tumores [101].

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a síntese de cardiolipina é realizada pela enzima cardiolipina sintase, codificada pelo gene CRD1 [102], cuja expressão, no presente estudo, foi relacionada à manutenção da qualidade do conteúdo lipídico mitocondrial.

A aconitase mitocondrial é um importante indicador da funcionalidade do CAC, visto que a diminuição dos níveis desta enzima está relacionada a um declínio na eficiência bioenergética mitocondrial [103]. Alterações nos níveis da aconitase mitocondrial são reportados frequentemente em tumores malignos de próstata [104,105]. Para avaliação deste parâmetro em levedura, foi selecionado o gene ACO1, que codifica a aconitase mitocondrial, responsável por catalisar a conversão de citrato em isocitrato no CAC.

Uma alteração mitocondrial importante, e uma das mais frequentes observadas em tumores, é a alteração da dinâmica da proteína VDAC (*voltage dependente anion channel*), uma porina localizada na membrana mitocondrial externa responsável pelo transporte de diversos íons e metabólitos entre o citosol e a mitocôndria. Esta proteína atua controlando diversas sinalizações entre a mitocôndria e o restante da célula, sendo um ponto de convergência de diversas vias de sobrevivência e morte celular, regulando processos de apoptose dependentes da mitocôndria e processos bioenergéticos [106]. Em células tumorais existe uma elevada associação entre a hexoquinase 2 (HK2) e a VDAC na membrana mitocondrial externa. Isto garante um benefício metabólico à célula tumoral para a manutenção elevada taxa glicolítica observada no efeito Warburg, visto que a hexoquinase é capaz de obter ATP diretamente da produção mitocondrial com esta associação [106]. Além disso, a associação VDAC-HK2 impede sinalizações de morte celular nas células tumorais, visto que este processo é

dependente da permeabilização da membrana mitocondrial externa, um evento decisivo para a apoptose celular que depende da disponibilidade e integridade de VDAC [107].

Para avaliação deste parâmetro em *Sacharomyces cerevisiae*, foi selecionado o gene *POR1*, que codificada uma porina mitocondrial do tipo VDAC fundamental para a manutenção da permeabilidade e estabilidade osmótica mitocondrial na levedura [108].

Quanto ao segundo grupo gênico avaliado, a remodelação bioenergética observada na transformação tumoral é bastante característica e intimamente relacionada à manutenção da elevada taxa glicolítica celular, que mantém a fermentação mesmo em presença de oxigênio. O efeito Warburg é a característica mais marcante da remodelação bioenergética tumoral e pode ser relacionado a um fenótipo bastante presente em células tumorais: um aumento da expressão da hexoquinase 2.

Existem quatro isoformas da hexoquinase em mamíferos (HK1, HK2, HK3, HK4), sendo que as três primeiras apresentam elevada afinidade por glicose, enquanto que a isoforma 4 apresenta baixa afinidade, sendo expressa apenas em células específicas, como as hepáticas. Destas, apenas o aumento da expressão da isoforma HK2, de alta afinidade por glicose, foi observada em células de câncer e associada com queda de sobrevida de pacientes [109]. O aumento da expressão de HK2, associada ao “silenciamento” da expressão de outras isoformas, principalmente da HK4 [110], é um fenótipo frequentemente reportado em células tumorais e um dos alvos estudados para a terapia metabólica contra a doença [111].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta três isoformas distintas da hexoquinase (HXK1, HXK2, GLK1), sendo a isoforma 2 a mais expressa em condição fermentativa, inibindo a expressão das outras isoformas em condição de repressão catabólica pela glicose (efeito Crabtree) [112]. Tal fenômeno é semelhante ao observado no efeito Warburg e, por isso, o gene *HXK2* foi selecionado para avaliação deste parâmetro no processo de transformação metabólica em levedura.

O terceiro grupo gênico selecionado corresponde àqueles genes associados à desregulação de crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Tais genes estão intimamente relacionados ao fenótipo metastático de diversos tipos de câncer. Dentre os genes que codificam proteínas associadas a tais processos celulares,

alguns dos mais frequentemente alterados em células de câncer são os oncogenes RAS e AKT.

As proteínas Ras são pequenas proteínas de ligação ao nucleotídeo de guanina, que oscilam entre o estado ligado a GTP (estado ativo) ou ligado a GDP (estado inativo) [113]. Tais proteínas são GTPases associadas à face interna da membrana plasmática que controlam diversas vias celulares através da razão GDP / GTP, como a progressão do ciclo celular, transcrição, sobrevivência, transporte de vesículas e sinalização de cálcio [114]. Existe uma elevada frequência mutacional nos genes RAS em uma ampla variedade de cânceres humanos, incluindo três dos quatro tipos de câncer de maior mortalidade (pulmão, cólon e pancreático), que apresentam as maiores taxas mutacionais de RAS (pâncreas - 90%, cólon - 50% e pulmão 30%) [115]. Tais mutações comprometem a atividade de GTPase de RAS, impedindo a hidrólise de GTP e, portanto, causando o acúmulo de RAS na forma ativa, ligada ao GTP, o que desregula diversas vias celulares.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta dois genes, *RAS 1* e *RAS2*, homólogos aos oncogenes RAS humanos, que na levedura regulam a via de sinalização cAMP/PKA, envolvida na sinalização do estado nutricional celular, e em diversas adaptações celulares a mudanças no ambiente externo, que incluem o *shift* diáuxico, respostas à escassez nutricional, estresse oxidativo e choque térmico [116]. Estudos com cepas mutantes demonstraram ainda que Ras é um importante regulador do metabolismo energético mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae* [117–119]. Desta forma, os genes *RAS 1* e *RAS 2* foram selecionados para avaliação de expressão nas cepas em estudo.

A proteína Akt é uma das quinases mais frequentemente encontradas hiperativas em câncer. A hiperativação de Akt está associada, aumento do crescimento celular, proliferação, desregulação do metabolismo energético e resistência à apoptose [120,121]. Akt é capaz de fosforilar diversas proteínas em células de mamíferos, no entanto ainda não se sabe especificamente os alvos *downstream* de Akt mais críticos à tumorigênese, apesar de mTOR ser um dos principais candidatos [133]. Diversas oncoproteínas e supressores de tumores que regulam sinalizações celulares e a modulação metabólica convergem com a via de transdução de sinal AKT, e seu equilíbrio é alterado em diversos tipos de carcinomas, ativando ou inativando proteínas inter-relacionadas [122].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta o gene *SCH9* que codifica uma proteína quinase serina/treonina da família AGC, com o domínio catalítico semelhante ao da Akt humana. Sch9p atua na regulação da longevidade celular, estimulação de crescimento, na sinalização de glicose na levedura, estímulo glicolítico, além de integrar sinais nutricionais e regular o crescimento e tamanho celular de acordo com a fonte de carbono [20,123,124]. Cepas deletadas em Sch9p apresentam uma extensão cronológica de vida, e maior expressão de genes associados à CTE com um aumento da respiração mitocondrial, sendo proposto que SCH9 é um efetor da repressão da atividade respiratória mediada por TOR em células crescendo em glicose [125]. Desta forma, este homólogo de oncogene em levedura desempenha um importante papel na regulação do metabolismo celular, principalmente na regulação bioenergética. Devido a estas semelhanças, este gene foi selecionado para avaliação de expressão.

A Tabela 3 resume e descreve os genes selecionados cuja expressão foi avaliada em cada grupo.

Tabela 2. Genes de *Saccharomyces cerevisiae* selecionados para avaliação de expressão. Os genes foram relacionados a transformações associadas à alteração da dinâmica mitocondrial (*ACO1, POR1, CRD1*), remodelação bioenergética (*HXK2*) e desregulação de crescimento (*RAS1, RAS2, SCH9*).

Gene	Nome Funcional	Descrição*
ACO1	Aconitase	Catalisa a conversão de citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico (CAC); requerida para a manutenção do mtDNA.
POR1	Porina	Porina mitocondrial requerida para a manutenção da permeabilidade de íons e metabólitos entre a mitocôndria e o citosol e para estabilidade osmótica mitocondrial.
CRD1	Cardiolipina sintase	Catalisa a síntese de cardiolipina (CL), um fosfolipídeo essencial para a integração correta de proteínas na membrana mitocondrial, para a manutenção da morfologia tubular mitocondrial e para eventos de fusão mitocondrial.
HXK2	Hexoquinase 2	Isoforma 2 da hexoquinase; catalisa a fosforilação da glicose na primeira etapa da via glicolítica; predominante durante o crescimento em glicose; migra para o núcleo e reprime a expressão das isoformas HXK1 e GLK1 e induz sua própria expressão; desempenha um papel importante na repressão catabólica.

RAS1	GTPase	GTPase envolvida na sinalização mediada pela proteína-G na ativação por adenilato ciclase; atua no controle da proliferação celular; homóloga aos proto-oncogenes Ras de mamíferos.
RAS2	GTPase	Proteína de ligação ao GTP; regula a respostas de escassez ao nitrogênio e crescimento; homóloga aos proto-oncogenes Ras de mamíferos .
SCH9	Quinase	Quinase da família AGC; homóloga da quinase Akt de mamíferos; requerida para a regulação da biogênese de ribossomos, iniciação de tradução e regulação do ciclo celular; regula a atividade cAPK; integra sinais nutricionais e de estresse para regular a extensão de vida celular.

Para investigar o papel exercido por Rtg2p sobre a expressão dos genes selecionados, foi realizada uma quantificação relativa de expressão por RT-qPCR entre as cepas WT e mutante *rtg2Δ*, crescidas em meio YPD até a fase de metabolismo respiratório. As expressões relativas da cepa mutante *rtg2Δ* em relação à cepa WT estão especificadas na Figura 16 e detalhadas na Tabela 4.

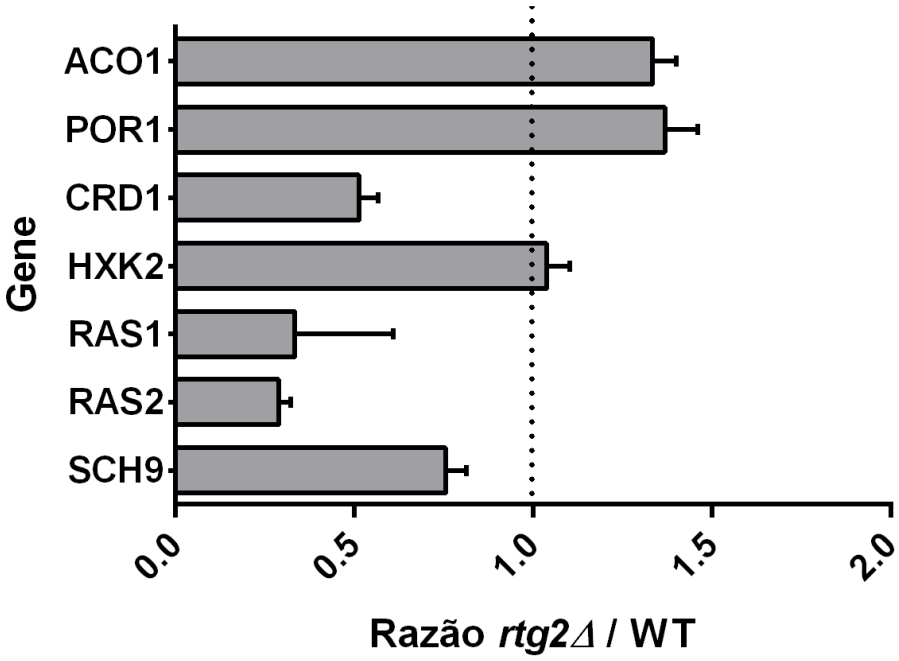

Figura 13. Expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência.

Tabela 3. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência.

Expressão Gênica Relativa *rtg2Δ* / WT	
Gene	**Vezes de Aumento (média ± DP)**
ACO1	1,33 ± 0,07
POR1	1,37 ± 0,09
CRD1	0,51 ± 0,05
HXK2	1,04 ± 0,07
RAS1	0,33 ± 0,3
RAS2	0,29 ± 0,03
SCH9	0,75 ± 0,06

Observou-se que a deleção de Rtg2p ocasionou um aumento de 33% na expressão de *ACO1* e 37% na expressão de *POR1*, indicando, conforme já discutido, que a deleção de Rtg2p aumenta a quantidade mitocondrial. Houve uma redução de aproximadamente 50% na expressão de *CRD1*, indicando que, possivelmente, ocorre uma queda na síntese de cardiolipina. Uma vez que a cardiolipina é um fosfolipídeo fundamental para manutenção da funcionalidade e estrutura mitocondrial, uma queda na síntese deste lipídeo ocasionaria uma diminuição da qualidade mitocondrial e, consequentemente, do perfil respiratório celular. Tais resultados de expressão corroboram aos experimentos fenotípicos realizados anteriormente, visto que a deleção de Rtg2p ocasionou um aumento da quantidade mitocondrial, o que se relaciona ao aumento da expressão de *ACO1* e *POR1*, às custas da geração de uma subpopulação respiratório-deficiente (*petite*), ou seja, de baixa qualidade mitocondrial. Desta forma, pode-se concluir que Rtg2p é necessário não apenas para a manutenção da quantidade mitocondrial, como também para a modulação da qualidade mitocondrial.

O perfil de expressão da hexoquinase 2 se manteve o mesmo após a deleção de Rtg2p. Em metabolismo fermentativo sob repressão catabólica, a glicose-6-fosfato (G6P) formada a partir da fosforilação da glicose pela hexoquinase 2 é

direcionada majoritariamente para a via glicolítica para obtenção de ATP. Já em metabolismo respiratório, no qual a expressão foi avaliada, a G6P é um intermediário metabólico direcionado tanto para a via glicolítica, quanto para a via das pentoses fosfato, para síntese de glicogênio e síntese de trealose. Visto que se trata de um intermediário de diversas vias metabólicas distintas em metabolismo respiratório, não é surpresa que a célula busque manter os níveis de expressão e atividade constantes. Além disso, a isoforma hexoquinase 2 é mais preponderante em metabolismo fermentativo sob repressão catabólica. Em metabolismo respiratório, em condição de depleção de glicose, a isoforma Hxk1p passa a ser a mais expressa, enquanto que a isoforma Hxk2p tem sua expressão diminuída [126]. Desta forma, não se observa uma variação preponderante na expressão de *HXK2* em metabolismo respiratório.

Em relação à expressão dos genes de levedura homólogos aos oncogenes humanos, houve uma redução de aproximadamente 70% na expressão de *RAS1* e *RAS2*, e de 25% na expressão de *SCH9*. Tal resultado indica que a presença de Rtg2p e, portanto, de uma via de sinalização retrógrada ativa, é importante para a expressão de genes da levedura homólogos a oncogenes humanos, que estão associados à desregulação de crescimento e sinalização intracelular. Pelos resultados, Rtg2p afeta a positivamente a expressão de *CRD1*, *RAS1*, *RAS2* e *SCH9*, e negativamente a expressão de *ACO1* e *POR1*, em metabolismo respiratório durante crescimento em YPD.

Uma vez que a presença da via RTG é importante para a expressão dos genes *RAS1*, *RAS2* e *SCH9*, homólogos a oncogenes humanos, buscou-se investigar como a expressão destes genes é alterada após a célula ser submetida a um tratamento adaptativo progressivo a condições de dano respiratório (inibição respiratória). Inicialmente, para avaliar se a inibição da atividade respiratória mitocondrial afeta a expressão dos genes *RAS* e *SCH9* de levedura, homólogos a oncogenes humanos, a cepa WT foi submetida a um tratamento adaptativo em condições de inibição respiratória. As células foram inoculadas a uma concentração baixa em meio YPD contendo uma concentração adequada do respectivo inibidor respiratório, de modo a garantir que as células estivessem com a via respiratória inibida desde o início de seu desenvolvimento, assegurando que o dano respiratório ocorresse de modo lento e sustentado ao longo de todo o crescimento celular. Em tais condições, o crescimento em meio contendo o inibidor respiratório foi mantido

por um período de 72 h, após o qual as células foram coletadas, plaqueadas para estoque e reinoculadas em baixa concentração, em meio contendo uma concentração maior do inibidor respiratório em relação ao inóculo anterior. Tal procedimento foi repetido diversas vezes, sempre aumentado a concentração de inibidor a cada inóculo, de modo a garantir que a resposta celular à condição de dano respiratório (disfunção mitocondrial) fosse lenta e adaptativa, uma vez que, segundo a teoria metabólica do câncer, a transformação celular ocorre de modo lento e progressivo, num processo adaptativo que remodula o perfil metabólico e genético de modo irreversível, e não apenas transiente.

Inicialmente, a condição adaptativa foi realizada utilizando-se concentrações crescentes do inibidor respiratório cianeto (CN^-), que inibe o processo de redução do oxigênio molecular no complexo IV, bloqueando o processo redox da cadeia respiratória. As concentrações utilizadas deste inibidor variaram de modo crescente de 5 μM a 400 μM, sendo feitas um total de seis adaptações sucessivas das cepas em YPD por um período de 72 h cada. A concentração celular no meio ao final da adaptação foi avaliada por leitura espectrofotométrica, para indicação da fase metabólica de crescimento (primeira fase exponencial – metabolismo fermentativo ou segunda fase exponencial – metabolismo respiratório) da cepa no momento da coleta celular, uma vez que a curva de crescimento de cada uma delas foi previamente determinada. Apesar de ser submetida à condição de inibição respiratória constante durante todo o período de crescimento, as células foram capazes de crescer após o *shift* diáuxico em todas as adaptações realizadas com cianeto. Tal observação indica que as células foram capazes de realizar a transição do metabolismo fermentativo para oxidativo (respiratório), mesmo na presença do inibidor respiratório, indicando que a inibição com cianeto não foi efetiva.

O mesmo experimento foi realizado utilizando-se a antimicina, um inibidor respiratório que atua sobre o complexo III da CTE, sendo realizadas três adaptações sucessivas com o inibidor a 30 μM / 72 h, 100 μM / 96 h e 100 μM / 72 h. A inibição da respiração celular pela ação da antimicina é reportada como um agente causador de disfunção mitocondrial que, por sua vez, gera danos mutacionais no genoma nuclear [134]. Em todas as adaptações realizadas em antimicina as células encontravam-se estacionadas na diauxia no momento da coleta, portanto, incapazes de realizar a transição para o metabolismo respiratório. Tal observação é um indicativo de que a inibição com o inibidor respiratório antimicina foi eficiente, de

modo que tal inibidor foi selecionado para as adaptações posteriores. A maior eficiência na inibição respiratória com utilização da antimicina em relação ao cianeto pode ser justificada pelo fato de o complexo III ser o principal gerador de EROs na mitocôndria [90,127]. Sendo assim, a desestabilização da ubisemiquinona no sítio Qi pela antimicina, que impede a reoxidação do citocromo b_H e bloqueia o fluxo de elétrons na CTE, possivelmente ocasiona uma aumento na produção de EROs e, consequentemente, um maior dano estrutural e funcional à mitocôndria e à respiração celular.

Apesar da estacionarem na diauxia durante o tratamento com antimicina e, portanto, incapazes de respirar na presença do inibidor, aproximadamente 80% das células após a primeira adaptação com antimicina ainda são respiratório-competentes, enquanto que esta taxa diminui para aproximadamente 70% após a última adaptação com o inibidor (Figura 17). Sendo assim, a inibição respiratória com antimicina ocasiona um progressivo aumento da população *petite* ao longo da inibição respiratória, possivelmente devido a um acúmulo de danos à mitocôndria ocasionados pela geração de EROs durante a inibição do complexo III. Enquanto algumas células são capazes de, através da ativação de vias de recuperação mitocondrial, adaptarem-se à nova condição metabólica, modulando as vias do mitocheckpoit [60], uma subpopulação não é capaz de realizar as adaptações necessárias torna-se, portanto, respiratório-deficiente (*petite*).

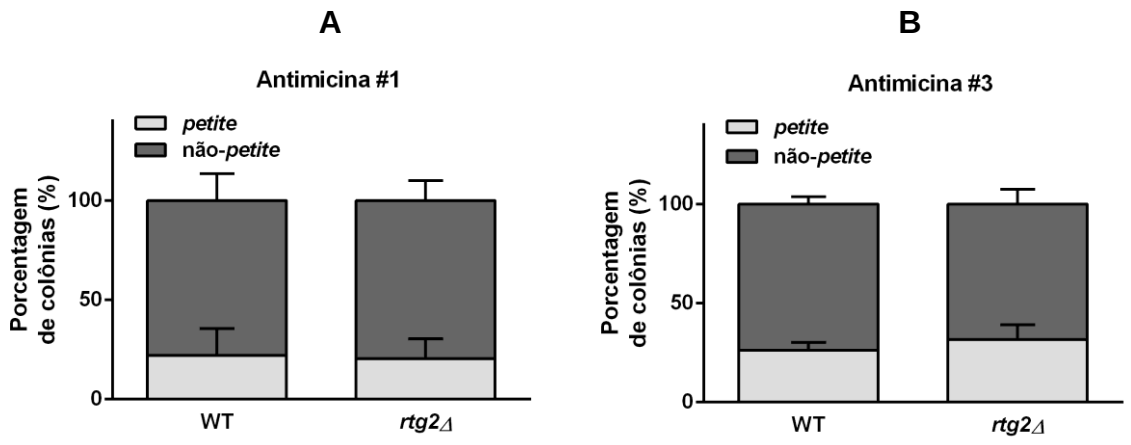

Figura 14. Porcentagem populacional de colônias respiratório-deficientes (*petites*) e respiratório-competentes (não-*petites*) das cepas WT e *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD) após (A) a primeira adaptação em antimicina (30 µM / 72 h) e (B) a terceira e última adaptação em antimicina (100 µM / 72 h).

Vale ressaltar que a cepa utilizada para os experimentos de avaliação de expressão é aquela gerada após a última adaptação ao inibidor respiratório, que é replaqueada em meio YPD sólido para recuperação de viabilidade e, após o crescimento, reinoculada em meio YPD líquido sem inibidor para os ensaios. Desta forma, o fenótipo / genótipo resultante após o crescimento no meio sem inibidor pode ser relacionado a uma consequência direta da remodelação irreversível da expressão gênica e do perfil metabólico, que é transferido às células filhas, e não de um efeito transiente ocasionado pela presença do inibidor respiratório.

As cepas WT e *rtg2Δ* adaptadas ao crescimento sob dano respiratório (identificadas como WT* e *rtg2Δ**), após serem reinoculadas em meio YPD sem inibidor foram capazes de realizar a transição para o metabolismo respiratório. Portanto, a respiração celular permanece bloqueada apenas enquanto a antimicina está presente no meio, de modo que as células-filhas provenientes das cepas adaptadas são capazes de realizar a transição metabólica da fermentação para a respiração.

Para avaliar o perfil de expressão foi realizado experimento de quantificação comparativa de expressão via RT-qPCR. Para fins de discussão, foram consideradas relevantes apenas variações de expressão acima de 10%, positiva ou negativamente. Variações comparativas menores que 10%, para cima ou para baixo, foram consideradas irrelevantes e, portanto, iguais em termos de expressão.

Apesar de ser capaz de realizar a transição metabólica para respiração (YPD), a cepa WT*, adaptada à disfunção respiratória, apresentou uma variação significativa na expressão dos genes *RAS* e *SCH9*, homólogos a oncogenes humanos, nesta fase metabólica. A cepa WT* apresentou uma diminuição de 40% na expressão de *RAS 1*, 10% de diminuição na expressão de *RAS 2* e um aumento expressivo de 47% na expressão de *SCH9* em relação à cepa WT, não-adaptada, crescida nas mesmas condições. (Figura 18, Tabela 5).

A remodelação do perfil de expressão observada se trata de um fenômeno irreversível, uma vez que é dependente do genótipo transferido às células-filhas, sendo um fenômeno associado a transformação metabólica celular. A diminuição na expressão de RAS1 após adaptação ao dano respiratório pode ser um indicativo inicial da perda da capacidade celular de responder de maneira adequada a sinalizações que controlam o crescimento e progressão do ciclo celular, processos sinalizados e regulados, dentre outros, por *RAS*. Desta forma, uma diminuição na

expressão de *RAS1* pode estar relacionada a uma modulação adaptativa celular para aumentar a capacidade proliferativa, além de estender a vida cronológica celular [128]. Uma vez que *SCH9* é um importante efetor da repressão da atividade respiratória celular [125], sendo desfosforilado em condições de disfunção mitocondrial causada por defeitos no mtDNA [129], o aumento de sua expressão verificado na população adaptada ao dano respiratório pode ser relacionado a um comportamento de inibição progressiva da capacidade respiratória celular, de modo ocasionar uma adaptação irreversível do metabolismo à nova condição de disfunção da respiração celular.

Tais resultados em conjunto indicam que ocorre uma remodelação irreversível no perfil de expressão de genes de *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente *RAS1* e *SCH9*, homólogos a conhecidos oncogenes humanos, como consequência de uma adaptação celular à disfunção respiratória, sugerindo uma relação associativa entre disfunção respiratória e remodelação irreversível de genes associados ao controle de crescimento e proliferação celular na levedura, semelhante à remodelação oncogênica observada em células tumorais humanas.

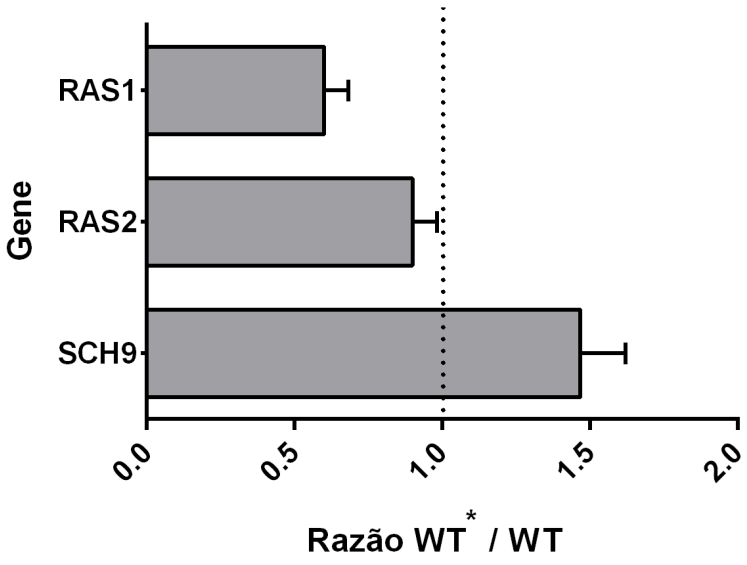

Figura 15. Expressão gênica relativa WT* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina).

Tabela 4. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa WT* / WT em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (* cepa adaptada em antimicina).

Expressão Gênica Relativa WT * / WT	
Gene	**Vezes de Aumento (média ± DP)**
RAS1	0,60 ± 0,08
RAS2	0,90 ± 0,08
SCH9	1,47 ± 0,15

Para investigar de modo mais detalhado o efeito do dano respiratório sustentado sobre a expressão gênica das células-filhas, o mesmo experimento foi realizado para a cepa *rtg2Δ**. A cepa *rtg2Δ** apresentou um aumento de 16 % na expressão de *RAS1*, 5% de aumento na expressão de *RAS2* e um aumento expressivo de 128% na expressão de *SCH9* em relação à cepa mutante *rtg2Δ*, não-adaptada, crescida nas mesmas condições (Figura 19, Tabela 6).

Tais resultados reafirmam que a adaptação celular ao dano respiratório ocasiona uma modulação positiva e expressiva do gene *SCH9*, corroborando com os resultados obtidos para a comparação WT* / WT. Uma vez que a cepa mutante não apresenta Rtg2p e foi observada uma remodelação positiva da expressão de *SCH9* nesta cepa após adaptação, semelhante à observada na cepa WT, há um indicativo de que a modulação gênica de *SCH9* ocorre de modo independente ou parcialmente dependente de Rtg2p, sendo, possivelmente, um efeito multifatorial de adaptação à disfunção respiratória, que envolve outras vias e cascatas de sinalização intracelulares. No entanto, uma vez que o aumento na expressão de *SCH9* foi quantitativamente distinto entre comparações WT* / WT (aumento de 47%) e *rtg2Δ** / *rtg2Δ* (aumento de 128%), possivelmente Rtg2p desempenha um papel neste processo, evitando uma hiperexpressão de *SCH9* em condição de adaptação à disfunção respiratória.

Pode-se concluir ainda que na ausência de Rtg2p e, portanto, de uma via RTG funcional, o aumento da expressão dos genes *RAS* não é induzida, indicando

que a presença de uma via de sinalização retrógrada é fundamental para a modulação dos genes RAS. A partir desta observação, levanta-se o questionamento se tal processo também ocorre de modo semelhante na transformação celular de mamíferos.

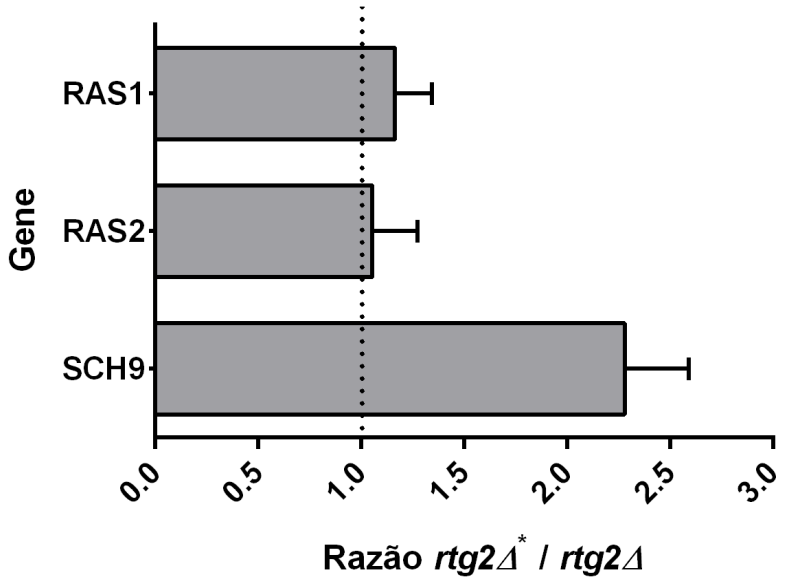

Figura 16. Expressão gênica relativa *rtg2Δ** / *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina).

Tabela 5. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa *rtg2Δ** / *rtg2Δ* em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (* cepa adaptada em antimicina).

Expressão Gênica Relativa *rtg2Δ / rtg2Δ***	
Gene	**Vezes de Aumento (média ± DP)**
RAS1	1,16 ± 0,18
RAS2	1,05 ± 0,22
SCH9	2,28 ± 0,31

De modo a investigar de modo mais específico o papel de Rtg2p sobre o processo dinâmico de remodelação do perfil de expressão à adaptação à disfunção

respiratória, foi feita uma avaliação da expressão gênica da cepa WT* em relação à cepa *rtg2Δ**, ambas crescidas em YPD até o metabolismo respiratório.

Observou-se que a modulação de expressão gênica durante a transformação celular envolve a participação da via retrógrada (Rtg2p) (Figura 20, Tabela 7). A cepa WT*, que contém Rtg2p, apresenta uma expressão 25% maior de *RAS1*, 140% maior de *RAS2* e 10% menor de *SCH9*, em relação à cepa mutante adaptada *rtg2Δ**.

Tais resultados indicam que Rtg2p modula principalmente a expressão de *RAS1* e *RAS2* durante a transformação celular, corroborando com as resultados anteriores que sugerem que a integridade funcional da via RTG é fundamental à modulação dos genes RAS após a adaptação à disfunção respiratória. A superexpressão de *RAS2* já foi reportada aumentando a vida celular em 30% e atrasando o aumento no tempo de geração da levedura associado ao envelhecimento celular [130]. Desta forma, o aumento da expressão de *RAS2* da cepa WT* em relação à *rtg2Δ** durante a transformação celular pode representar um mecanismo de manter a viabilidade e atrasar o envelhecimento diante do dano respiratório, em uma resposta adaptativa permanente que mantém a célula viável para reestruturação permanente do metabolismo.

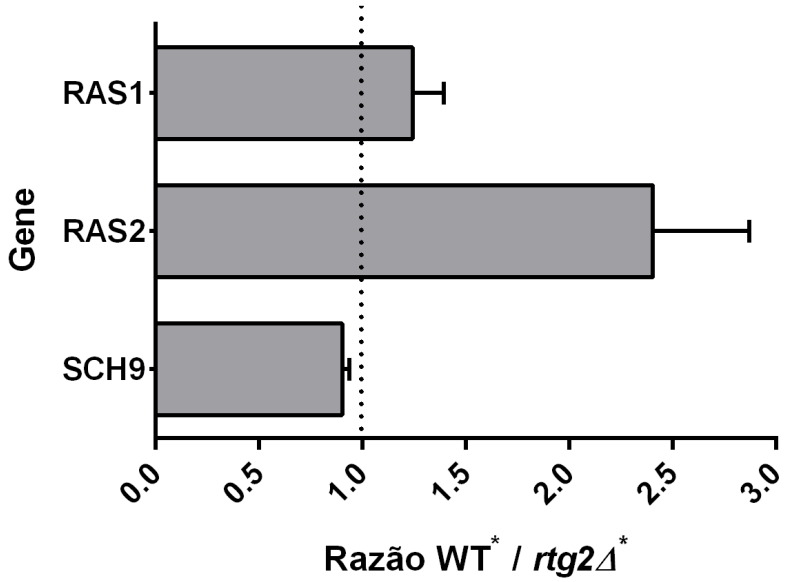

Figura 17. Expressão gênica relativa WT* / *rtg2Δ** em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se ACT1 como gene de referência. (* cepa adaptada em antimicina).

Tabela 6. Valores da média e do desvio padrão dos dados de expressão gênica relativa WT* / *rtg2Δ** em metabolismo respiratório (YPD), via análise por RT-qPCR de cDNA derivado de mRNA, calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando-se *ACT1* como gene de referência (*cepa adaptada em antimicina).

Expressão Gênica Relativa WT* / *rtg2Δ**	
Gene	**Vezes de Aumento (média ± DP)**
RAS1	1,25 ± 0,15
RAS2	2,40 ± 0,47
SCH9	0,89 ± 0,04

V. CONCLUSÕES

Sobre concluir:

“Era sempre bom ter terminado. Bom ter produzido, ter causado a existência de alguma coisa. De uma forma anestesiada ele compreendeu e apreciou a bravura do ato (...). Ele compreendia agora, finalmente, que era um tanto bronco na execução daquele truque, mas era o único que conhecia, e se ele sempre terminava executando-o de forma inepta, jamais o executara sem amor.

Ele tocou a pilha de papel e sorriu um pouco.”

- Stephen King, Misery

5. CONCLUSÕES

A proteína Rtg2p, sensor da disfunção mitocondrial e ativador da via RTG, exerce um papel na modulação bioenergética, controlando o consumo de glicose em metabolismo fermentativo (YPD) e o consumo de oxigênio em metabolismo respiratório (YPD); influencia na adaptabilidade metabólica a fontes de carbono fermentáveis (glicose) e não-fermentáveis (glicerol); modula a quantidade e a qualidade mitocondrial; afeta positivamente a expressão de *CRD1*, *RAS1*, *RAS2* e *SCH9*, e negativamente a expressão de *ACO1* e *POR1*, em metabolismo respiratório durante crescimento em YPD.

A adaptação ao dano respiratório sustentado (inibição respiratória com antimicina) afeta de modo irreversível a expressão de genes *RAS1*, *RAS2* e *SCH9*, homólogos a oncogenes humanos, indicando que existe uma relação associativa entre a adaptação ao dano respiratório e modulação de genes na levedura cujos correspondentes humanos estão envolvidos na transformação celular tumoral. A presença de Rtg2p e, consequentemente, da integridade funcional da via RTG, é fundamental à remodelação da expressão dos genes RAS (*RAS1* e *RAS2*) na adaptação celular (transformação celular) à disfunção respiratória. Desta forma, a ativação sustentada da resposta retrógrada (RTG) é capaz de ocasionar uma remodelação gênica irreversível no núcleo.

Tais resultados em conjunto observados em *Saccharomyces cerevisiae* fornecem um indicativo interessante que aponta a via de sinalização retrógrada celular como desempenhando um papel fundamental na remodelação permanente do perfil de expressão nuclear, ativando genes na levedura que são correspondentes a importantes genes envolvidos na transformação tumoral.

VI. REFERÊNCIAS

Sobre ler:

O tempo fica
cada vez
mais lento
e eu
lendo
lendo
lendo
vou acabar
virando lenda

- Paulo Leminski

6. REFERÊNCIAS

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).
2. Gonzalez, M. J. *et al.* The bio-energetic theory of carcinogenesis. *Med. Hypotheses* **79,** 433–439 (2012).
3. Tomasetti, C., Li, L. & Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* **355,** 1330-1334 (2017).
4. Vogelstein, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. *Science* **339,** 1546-1558 (2013).
5. Amer, M. H. Gene therapy for cancer : present status and future perspective. *Mol Cell Ther* **2,** 1–19 (2014).
6. Szent-Györgyi, A. The Living State and Cancer. *Submolecular Biol. Cancer* **74,** 3–18 (2008).
7. Seyfried, T. N. & Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **18,** 43–73 (2013).
8. Seyfried, T. N. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front Cell Dev Biol* **3,** 1–12 (2015).
9. Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M. & Agostino, D. P. D. Cancer as a metabolic disease : implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* **35,** 515–527 (2014).
10. McKinnell, R. G. *et al*. Transplantation of Pluripotential Nuclei from Triploid Frog Tumors. *Science* **165 (3891)**, 394–396 (1969)
11. Israel, B. A. & Schaeffer, W. I. Cytoplasmic suppression of malignancy. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* **23,** 627–632 (1987).
12. Shay, J. W. Cytoplasmic Suppression of Tumorigenicity in Reconstructed Mouse Cells. *Cancer Res.* **48,** 830–833 (1988).
13. Li, L., Connelly, M. C., Wetmore, C., Curran, T. & Morgan, J. I. Mouse Embryos Cloned from Brain Tumors. *Cancer Res.* **63,** 2733–2736 (2003).
14. Mintz, B. & Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72,** 3585–9 (1975).
15. Hochedlinger, K. *et al.* Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev.* **18,** 1875–1885 (2004).
16. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11,** 325–37 (2011).
17. Ferreira, L. M. R. Cancer metabolism : The Warburg effect today. *Exp. Mol. Pathol.* **89,** 372–380 (2010).
18. Warburg, O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* **123,** 309-314 (1956).
19. Shestov, A. A. *et al.* Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife* 1–18 (2014).
20. Diaz-ruiz, R., Rigoulet, M. & Devin, A. Biochimica et Biophysica Acta The Warburg and Crabtree effects : On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *BBA - Bioenerg.* **1807,** 568–576 (2011).
21. Liberti, M. V & Locasale, J. W. The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells ? *Trends Biochem. Sci.* **41,** 211–218 (2016).
22. Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39,** 347–354 (2014).

23. Estrella, V. *et al.* Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. *Cancer Res.* **73(5),** 1524-1535 (2013).
24. Locasale, J. W. & Cantley, L. C. Review Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth. *Cell Metab.* **14,** 443–451 (2011).
25. Evertts, A. G. *et al.* H4K20 methylation regulates quiescence and chromatin compaction. *Mol. Biol. Cell* **24,** 3025-3037 (2013).
26. Cairns, R., Harris, I. & Mak, T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11,** 85–95 (2011).
27. Friis, R. M. N. *et al.* A glycolytic burst drives glucose induction of global histone acetylation by picNuA4 and SAGA. *Nucleic Acid Research* **37,** 3969–3980 (2009).
28. Wolf, A. *et al.* Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med* **208(2),** 313–326 (2011).
29. Scatena, R. Mitochondria and Cancer : A Growing Role in Apoptosis , Cancer Cell Metabolism and Dedifferentiation. *Adv. Exp. Med.* **942,** 287–308 (2012).
30. Vousden, K. H. & Ryan, K. M. p53 and metabolism. *Nat. Ver. Cancer* **9(10),** 691–700 (2009)..
31. Jazwinski, S. M. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833,** 400–409 (2013).
32. Biology, C. & Gabriel, A. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int. J. Biochem. Cell.* **41(10),** 2062–2068 (2009).
33. Couvillion, M. T., Soto, I. C., Shipkovenska, G. & Churchman, L. S. Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature* **533,** 1–17 (2016).
34. Schon, E. A., Dimauro, S. & Hirano, M. Human mitochondrial DNA : roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Ver. Genet.* **13(12),** 878–890 (2012).
35. Chandra, D. & Singh, K. K. Biochimica et Biophysica Acta Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *BBA - Bioenerg.* **1807,** 620–625 (2011).
36. Ballard, J. W. & Whitlock, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* **13,** 729–744 (2004).
37. Petros, J. A. *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 719–24 (2005).
38. Tong, Z. *et al.* Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma , type 3. *Nat Genet* **26,** 268–270 (2000).
39. Müller, U., Troidl, C. & Niemann, S. SDHC mutations in hereditary paraganglioma / pheochromocytoma. *Familial Cancer* **4,** 9–12 (2005).
40. Benn, D. E. *et al.* Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial phaeochromocytomas and paragangliomas , but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic phaeochromocytomas. *Oncogene* **22,** 1358–1364 (2006).
41. Hao, H. *et al.* SDH5 , a Gene Required for Flavination.*Science* **325,** 1139-1142 (2009).
42. Tomlison, I. P. M. *et al.* Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids , skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* **30,** 406–410 (2002).
43. Maximo, V. *et al.* GRIM-19 in Health and Disease. *Adv Anat Pathol* **15,** 46–53 (2008).
44. Huang, G. *et al.* GRIM-19, a Cell Death Regulatory Protein, Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I. *Mol. Cell. Biol.* **24(19),**

8447–8456 (2004).
45. Kulawiec, M., Ayyasamy, V. & Singh, K. K. p53 regulates mtDNA copy number and *mitocheckpoint* pathway. *J. Carcinog.* **8** (2009).
46. Chan, S. S. L. & Copeland, W. C. Biochimica et Biophysica Acta DNA polymerase gamma and mitochondrial disease : Understanding the consequence of POLG mutations. *BBA - Bioenerg.* **1787,** 312–319 (2009).
47. Singh, K. K., Ayyasamy, V., Owens, K. M., Koul, M. S. & Vujcic, M. Mutations in mitochondrial DNA polymerase- c promote breast tumorigenesis. *J. Hum. Genet.* **54,** 516–524 (2009).
48. Singh, K. K. *et al.* Cross Talk Between Mitochondria and Superoxide Generating NADPH Oxidase in Breast and Ovarian Tumors. *Cancer Biol. Ther.* **4(12),** 1367-1373 (2005).
49. Chandra, D. & Singh, K. K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1807(6),** 620–625 (2011).
50. Kwong, J. Q., Henning, M. S., Starkov, A. A. & Manfredi, G. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J. Cell. Biol.* **179(6),** 1163–1177 (2007).
51. Elliott, R. L., Jiang, X. P. & Head, J. F. Mitochondria organelle transplantation: Introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Res. Treat.* **136,** 347–354 (2012).
52. Kaipparettu, B. A. *et al.* Crosstalk from Non-Cancerous Mitochondria Can Inhibit Tumor Properties of Metastatic Cells by Suppressing Oncogenic Pathways. *PLoS One* **8,** 1–9 (2013).
53. Marques, F., Torelli, N. Q. & Kowaltowski, A. J. Mitochondrial Retrograde Signaling : Triggers, Pathways and Outcomes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015,** (2015).
54. Whelan, S. P. & Zuckerbraun, B. S. Mitochondrial Signaling : Forwards , Backwards and In Between. *Oxid. Med. Cell. Longev* **2013,** 1-10 (2013).
55. Cunha, F. M., Torelli, N. Q. & Kowaltowski, A. J. Mitochondrial Retrograde Signaling : Triggers, Pathways and Outcomes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015,** (2015).
56. Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J. & Jazwinski, S. M. Rtg2 Protein Links Metabolism and Genome Stability in Yeast Longevity. *Genetics* **166(2),** 765–777 (2004).
57. Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J. M., Atzpodien, W. & Holzer, H. Studies on the Regulation and Localization of the Glyoxylate Cycle Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **10(1),** 83–89 (1969).
58. Regev-rudzki, N., Karniely, S., Ben-haim, N. N. & Pines, O. Yeast Aconitase in Two Locations and Two Metabolic Pathways : Seeing Small Amounts Is Believing. **16,** 4163–4171 (2005).
59. Jazwinski, S. M. The retrograde response links metabolism with stress responses , chromatin-dependent gene activation , and genome stability in yeast aging. *Gene* **18(354),** 22–27 (2005).
60. Singh, K. K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. *FEMS Yeast Res.* **5(2),** 127–132 (2004).
61. Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial Signaling : The Retrograde Response. *Mol. Cell* **14(1),** 1–15 (2004).
62. Sa, L. & Formentini, L. The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Mol. Cell*

45(6), 731–742 (2012).
63. Tang, W. *et al.* Silencing of I k B β mRNA causes disruption of mitochondrial retrograde signaling and suppression of tumor growth in vivo. *Carcinogenesis* **33(9),** 1762–1768 (2012).
64. Pelicano, H. *et al.* Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J. Cell Biol.* **175(6),** 913–923 (2006).
65. Elstrom, R. L. *et al.* Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cencer Res.* **64(11)** 3892–3899 (2004).
66. Guaragnella, N. *et al.* The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2. **14,** 2–16 (2014).
67. Srinivasan, V., Kriete, A., Sacan, A. & Jazwinski, S. M. Comparing the yeast retrograde response and NF-kB stress responses : implications for aging. *Aging Cell* **9,** 933–941 (2010).
68. Knorre, D. A., Sokolov, S. S., Zyrina, A. N. & Severin, F. F. How do yeast sense mitochondrial dysfunction ? *Microb. Cell* **3(11),** 532–539 (2016).
69. Payne, B. A. I. & Chinnery, P. F. Mitochondrial dysfunction in aging : Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta.* **1847(11),** 1347–1353 (2015).
70. Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. Oxidative Stress , Mitochondrial Dysfunction , and Aging. *J. Signal Transduct.* **2012,** (2012).
71. Botstein, D. & Fink, G. R. Yeast : An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics* **189(3),** 695–704 (2011).
72. Kachroo, A. H. *et al*. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Scienc.* **348(921),** 921-925 (2015)
73. Kuzmenko, A., Derbikova, K., Salvatori, R. & Tankov, S. Aim-less translation : loss of Saccharomyces cerevisiae mitochondrial translation initiation factor mIF3 / Aim23 leads to unbalanced protein synthesis. *Sci. Rep.* **6,** 1–9 (2016).
74. Shadel, G. S. Yeast as a Model for Human mtDNA Replication. *Am. J. Hum. Genet.* **65(5),** 1230–1237 (1999).
75. Foury, F. Cloning and Sequencing of the Nuclear Gene MIP1 Encoding the Catalytic Subunit of the Yeast Mitochondrial DNA Polymerase. **264(34),** 20552–20560 (1989).
76. Merz, S. & Westermann, B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth , mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Genome Biol.* **10(9),** (2009).
77. Flores, C., Rodríguez, C. Petit, T. Gancedo, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional. *FEMS Microbiol. Rev.* **24(4),** 507-529 (2000).
78. Nevoigt, E. & Stahl, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **21(3),** 231-241 (1997).
79. Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. & Cabiscol, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1780(11),** 1217–1235 (2008).
80. Kirchman, P. A. & Botta, G. Copper supplementation increases yeast life span under conditions requiring respiratory metabolism. *Mech. Ageing Dev.* **128(2),** 187–195 (2007).
81. Jakubowski, W. & Bartosz, G. 2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive

oxygen species : what does it measure? *Cell Biol. Int.* **24(10),** 757–760 (2000).
82. Steels, E. L., Learmonth, R. P. & Watson, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* **140,** 569–576 (2017).
83. Stickland, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol*. **5,** 698-703 (1951).
84. Gardner, P. R., Nguyen, D. H. & White, C. W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **91(25),** 12248–12252 (1994).
85. Mannarino, C., Amorim, M. A., Pereira, M. D., Moradas-ferreira, P. & Panek, A. D. Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech. Ageing Dev.* **129(12),** 700–705 (2008).
86. Ståhlberg, A. *et al.* Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of ADH - genes to glucose stimuli. *BMC Genomics* **9(170),** 1–15 (2008).
87. Thornton, B. & Basu, C. Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **39(2),** 145–154 (2011).
88. Torelli, N. Q. *et al.* RTG1- and RTG2-dependent retrograde signaling controls mitochondrial activity and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae. Free Radic. Biol. Med.* **81,** 30-37 (2014). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.025
89. Hana, N. & Vrbacký, M. Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42(5),** 395–403 (2010).
90. Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278(38),** 36027–36031 (2003).
91. Quesada, N., Ferreira-júnior, J. R., Kowaltowski, A. J. & Marques, F. Free Radical Biology and Medicine RTG1- and RTG2-dependent retrograde signaling controls mitochondrial activity and stress resistance in Saccharomyces cerevisiae. *Free Radic. Biol. Med.* **81,** 30–37 (2015).
92. Lemasters, J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research.* **8(1),** 3–5 (2005).
93. Liu, Z., Butow, R. A. A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function *Mol. Cell. Biol.* **19(10),** 6720–6728 (1999).
94. Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A. & Butow, R. A. Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance. *Science* **307(5710),** 714–718 (2005).
95. Gaude, E. & Frezza, C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.* **2,** 1–9 (2014).
96. Yadav, P. K. & Rajasekharan, R. Cardiolipin deficiency causes triacylglycerol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* **2017.** (2017). doi:10.1007/s11010-017-3039-4
97. Hatch, G. M. Regulation of cardiolipin biosynthesis in the heart. *Mol. Cell. Biochem.* **159(2)** 139–148 (1996).
98. Jakovcic, S. *et al*. Cardiolipin content of wild type and mutant yeasts in relation to mitochondrial function and development. *J. Cell. Biol.* **48(3),** 490–502 (1971).
99. Lange, C., Nett, J. H., Trumpower, B. L. & Hunte, C. Specific roles of protein-

phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc 1 complex structure. *EMBO J.* **20(23),** 6591–6600 (2001).

100. Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J. H. & Seyfried, T. N. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria : lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J. Lipid Res.* **49(12),** 2545–2556 (2008).
101. Sapandowski, A., Stope, M., Evert, K. & Evert, M. Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation.*Mol. Cell. Biochem.* **410(1-2),** 175-185 (2015). doi:10.1007/s11010-015-2549-1
102. Tamai, T. & Greenberg, L. Biochemical characterization and regulation of cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bichim. Biophys Acta* **1046(2),** 214–222 (1990).
103. Yarian, C. S., Toroser, D., Sohal, R. S. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice *Mech. Ageing Dev.* **127(1),** 79–84 (2006).
104. Singh, K. K., Desouki, M. M., Franklin, R. B. & Costello, L. C. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues.*Mol. Cancer* **5(14),** 1–8 (2006).
105. Tsui, K., Chung, L., Wang, S. & Feng, T. Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells. *J. Mol. Endocrinol.* **51(1),** 131-141(2013).
106. Shoshan-Barmatz, V. & Golan, M. VDAC1 : from structure to cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry* **19(5),** 714-735 (2012).
107. Galluzzi, L. *et al.* Disruption of the hexokinase – VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene.* **27(34),** 4633–4635 (2008).
108. Galganska, H. *et al.* Communication between mitochondria and nucleus : Putative role for VDAC in reduction / oxidation mechanism. *Biochim. et Biophys. Acta.* **1797(6-7),** 1276–1280 (2010).
109. Mathupala, S. P., Rempel, A. & Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276 (46),** 43407–43412 (2001).
110. Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. Hexokinase II : Cancer ' s double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25(34),** 4777–4786 (2006).
111. Wang, H. *et al.* Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth. *Cancer Cell Int.* 1–11 (2016).
112. Herrero, P., Galindez, J., Ruiz, N. & Moreno, F. Transcriptional Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXKI , HXKII and GLKl genes. **11,** 137–144 (1995).
113. Hlavata, L., Aguilaniu, H., Pichova, A. & Nystro, T.The oncogenic RAS2 val19 mutation locks respiration, independently of PKA , in a mode prone to generate ROS. *EMBO J.* **22(13),** 3337–3345 (2003).
114. Cox, A. D. & Der, C. J. Ras history. *Small GTPases* **1(1),** 2–27 (2010).
115. Bos, J. L. Ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.* **49(17),** 4682-4689 (1989).
116. Diaz-ruiz, R., Uribe-carvajal, S., Devin, A. & Rigoulet, M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1796(2),** 252–265 (2009).
117. Devin, A. *et al.* Growth Yield Homeostasis in Respiring Yeast Is Due to a Strict

Mitochondrial Content Adjustment. *J. Biol. Chem.* **281(37),** 26779–26784 (2006).

118. Devin, A. & Rigoulet, M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292(1),** 52–58 (2007).
119. Dejean, L. *et al.* Activation of Ras cascade increases the mitochondrial enzyme content of respiratory competent yeast. *Biochem. and Biophys. Res Comm.* **293,** 1383–1388 (2002).
120. Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P. & Helman, L. J. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* **26(13),** 1932–1940 (2007).
121. Vara, F., Casado, E., Castro, J. De, Gonz, M. & Cejas, P. PI3K / Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30(2),** 193–204 (2004).
122. Altomare, D. A. & Testa, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24(50),** 7455–7464 (2005).
123. Fabrizio, P. *et al.* Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* **292(5515),** 288-290 (2013).
124. Crauwels, M. *et al.* The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the f ermenta ble-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* **143(8),** 2627–2637 (1997).
125. Lavoie, H. & Whiteway, M. Increased respiration in the *sch9Δ* mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot. Cell* **7(7),** 1127–1135 (2008).
126. Rodriguez, R., De La Cera, T., Herrero, P. & Moreno, F. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. J.* **355,** 625–631 (2001).
127. Bleier, L. & Dröse, S. Biochimica et Biophysica Acta Superoxide generation by complex III : From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys Acta* **1827(11-12),** 1320–1331 (2013).
128. Hlavatá, L., Nachin, L., Jezek, P. J. & Nyström, T. Elevated Ras / protein kinase A activity in Saccharomyces cerevisiae reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes. *Aging Cell.* **7(2),**148–157 (2008).
129. Kawai, S., Piccolis, M., Panchaud, N., Virgilio, C. De & Loewith, R. Mitochondrial Genomic Dysfunction Causes Dephosphorylation of Sch9 in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell.* **10(10),** 1367–1369 (2011).
130. Sun, J., Kale, S. P., Childress, A. M., Pinswasdi, C. & Jazwinskis, S. M. Divergent Roles of RASl and RAS2 in Yeast Longevity. *J. Biol. Chem.* **269(28),** (1994).
131. Tosato, V. *et al*. Warburg effect and translocation-induced genomic instability: two yeast models for cancer cells. *Front. Oncol.* **2**, 1-12 (2013).
132. Guha, M. & Avadhani, N. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion*. **13(6)** 577-591 (2013).
133. Hay, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell.* **8(3)**, 179-183 (2005).
134. Rasmussen, A. K. et al. Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Research. **31(14)**, 3909-3917 (2003).