



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MARIANA RODRIGUES XAVIER

**A DEFESA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO**

Recife
2022

MARIANA RODRIGUES XAVIER

**A DEFESA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO**

Tese de apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Marcos Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Will de Barros Pita

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Xavier, Mariana Rodrigues.

A defesa da levedura *dekkera bruxellensis* contra estresse oxidativo. / Mariana Rodrigues Xavier. – 2022.

102f. : il., fig.

Orientador: Marcos Morais.

Coorientador: Will de Barros Pita.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pósgraduação em ciências biológicas, 2022. Inclui referências.

1. Estresse oxidativo - fermentação. 2. Nitrato. 3. peróxido de hidrogênio. 4. Proteína quinase. 5. Tiorredozina. I. Morais, Marcos.(Orient.). II. Pita, Will de Barros. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-247

MARIANA RODRIGUES XAVIER

**A DEFESA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* CONTRA ESTRESSE
OXIDATIVO**

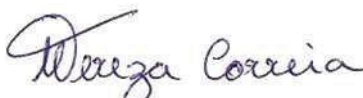
Tese de apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/06/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco



Profª. Drª. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco



Profª. Drª. Sandra Regina Ceccato Antonini (Examinadora Externa)
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. Diego Bonatto (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

À minha família e amigos, pelo incentivo e compreensão em toda minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À meus pais, Caio e Tânia, que são o meu alicerce e sempre me incentivaram a estudar e persistir em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Maíra e Caio Jr, que são a aliança mais forte que tenho na vida.

Aos meus sobrinhos, Heitor e Guilherme, por todo esse amor, carinho e descontração.

À meu noivo e companheiro, Pedro, por todo amor, apoio e compreensão em dias turbulentos. Você é o meu maior incentivador.

À meus avós, Manequinha e Didinha, meus maiores exemplos de persistência mesmo em meio às diversidades.

À meus amigos por serem sempre fiéis e nunca me abandonarem nessa jornada. Eu tenho os melhores.

Aos meus colegas e amigos da Marinha, o meu muito obrigada por todo apoio, ajuda e compreensão, em especial Lucimar, Juliana e Jéssika por me ajudarem a seguir com alegria e amor.

Aos amigos do Laboratório, em especial Gilberto, Karol, Jacke e Renan. Obrigada pela ajuda e disponibilidade. Vocês tornaram os meus dias mais leves e felizes.

Ao meu orientador, Marcos, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, imenso apoio, disponibilidade e confiança. Muito obrigada de todo coração.

Ao meu coorientador, Will, por todo apoio desde o início da minha caminhada acadêmica.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

Com todo amor, dedico esse título a todos vocês que sempre torceram e acreditaram em mim, MUITO OBRIGADA.

RESUMO

A levedura *Dekkera bruxellensis* utilizada neste trabalho foi isolada do processo industrial de produção de etanol combustível. Desde então vem sendo estudada para se compreender os mecanismos celulares e moleculares de sua adaptação àquele ambiente, principalmente aquele relacionado com a tolerância a estresse. Em face do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de defesa de *D. bruxellensis* contra estresse oxidativo usando peróxido de hidrogênio como modelo. Os resultados de concentração mínima inibitória e concentração mínima biocida mostraram que *D. bruxellensis* é mais sensível a estresse oxidativo do que *S. cerevisiae*. Isso é decorrente da ausência de produção de proteínas sulfidriladas nas células cultivadas em glicose e amônio, que é não revertida pela adição de glutatona no meio de cultivo. Essas proteínas são produzidas quando a fonte de carbono é exclusivamente respirável, tornando as células resistentes. Os dados são corroborados pela indução dos genes *GPX* e *SOD*. Em nitrato, esse mecanismo de defesa é inibido, tornando as células novamente sensíveis. A ausência de indução de tolerância pela restrição calórica e pelo pré-tratamento com doses subletais indicou que não há sistema de indução de tolerância nessa levedura. Por fim, experimentos com o uso de inibidores das quinases das vias PKA e TOR, reguladoras do crescimento celular, revelaram que esse mecanismo de defesa antioxidante depende principalmente do mecanismo regulatório da via TOR e permitiram a proposição de um modelo regulatório, ainda que preliminar, sobre o controle do mecanismo de defesa antioxidante em *D. bruxellensis* dependente do sistema Sod-Gpx-tiorredoxina.

Palavras-chave: estresse oxidativo; fermentação; nitrato; peróxido de hidrogênio; proteína quinase; tiorredoxina.

ABSTRACT

The yeast *Dekkera bruxellensis* used in this work was isolated from the industrial process of fuel ethanol production. Since then, it has been studied to understand the cellular and molecular mechanisms of its adaptation to that environment, especially that related to stress tolerance. In view of the above, the present work aimed to study the defense mechanism of *D. bruxellensis* against oxidative stress using hydrogen peroxide as a model. The results of minimum inhibitory concentration and minimum biocidal concentration showed that *D. bruxellensis* is more sensitive to oxidative stress than *Saccharomyces cerevisiae*. This is due to the absence of production of sulfhydrylated proteins in cells cultured in glucose and ammonium, which is not reversed by the addition of glutathione in the culture medium. These proteins are produced when the carbon source is exclusively breathable, making cells resistant. The data are supported by the induction of the GPX and SOD genes. In nitrate, this defense mechanism is inhibited, making the cells sensitive again. The absence of tolerance induction by caloric restriction and pretreatment with sublethal doses indicated that there is no tolerance induction system in this yeast. Finally, experiments with the use of inhibitors of PKA and TOR kinases, which regulate cell growth, revealed that this antioxidant defense mechanism depends mainly on the regulatory mechanism of the TOR pathway and allowed the proposal of a regulatory model, albeit preliminary, on the control of the antioxidant defense mechanism in *D. bruxellensis* dependent on the Sod-Gpx-thioredoxin system.

Keywords: oxidative stress; fermentation; nitrate; hydrogen peroxide; protein kinase; thioredoxin.

LISTA DE FIGURAS - REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Arvore filogenética das espécies do gênero <i>Dekkera</i> baseada na análise de restrição da sequência de DNA ribossomal 26S e nuclear 26S.	17
Figura 2	Representação por imagem das linhagens da espécie <i>Dekkera bruxellensis</i> . A – Representa a Linhagem CBS 74; B – Representa a linhagem CBS 2499; C – Linhagem Industrial GDB 248, cultivada em meio YPD através da técnica de microscopia de contraste de fase.	18
Figura 3	Via de assimilação do nitrato em leveduras. O nitrato é transportado do meio para o citosol celular, onde é reduzido a amônio em duas reações sucessivas catalisadas, respectivamente, por nitrito e nitrato redutase.	25
Figura 4	Estrutura química da Glutathione Reduzida (GSH).	28
Figura 5	Interconversão da Glutathione nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas Glutathione peroxidase (GSH-Px) e Glutathione redutase (GR).	36
Figura 6	Painel A e B - Crescimento celular das leveduras <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 (Painel A) e <i>S. cerevisiae</i> JP1 (Painel B) estimado na diferença da DOInicial pela DOFinal após, aproximadamente, 48h de ensaio em YNB. Na condição referência foi utilizada somente o meio com a levedura para padrão de crescimento. Painel C – Viabilidade celular realizada em placa contendo meio sólido YPD-Ágar, após 48h de crescimento, para as leveduras <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e <i>S. cerevisiae</i> JP1 após as células serem pré-tratadas por 1h em H ₂ O ₂ 48h.	41
Figura 7	Mostra os resultados dos testes de viabilidade realizados para a levedura <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e <i>S. cerevisiae</i> JP1 em uma respiro-fermentativa (glicose) e estritamente respirável (galactose, citrato e glicerol) na presença de concentrações crescentes de H ₂ O ₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). O pré-tratamento foi realizado por 1h em solução salina, em seguida 5µl de cada condição foi transferida para placa sólida de YPD-ágar. A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar padrão de viabilidade	42

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 1

- Figura 1 Perfil de sensibilidade da levedura GDB 248 em diferentes concentrações de H_2O_2 . Painel A - Crescimento celular estimado na diferença da DO ($DO_{Final} - DO_{Inicial}$) em espectrofotômetro a 600nm, após 48h de ensaio em meio líquido sintético YNB contendo glicose (20 g/L) em sulfato de amônio (5 g/L), das leveduras GDB 248 (círculo azul) e JP1 (círculo laranja). Painel B - Testes de viabilidade celular em placa com meio YPD-Ágar padrão após 48h de crescimento para as leveduras GDB 248 e JP1. Antes de serem semeadas na placa, as células foram pré-tratadas em concentrações crescentes do H_2O_2 (0,2 mM, 0,5 mM 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 Mm) em solução salina NaCl; 0,85%. 55
- Figura 2 Efeito da galactose na resposta de *D. bruxellensis* GDB 248 ao estresse induzido por H_2O_2 . Painel A - Testes de viabilidade para a levedura GDB 248 e JP1 em glicose e galactose expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar padrão de viabilidade. Painel B - Quantificação de tióis citosólicos expressos em mmol/gCel da levedura GDB 248. A barra azul representa os grupamentos sulfidril livres totais (proteicos e não proteicos), a barra laranja os grupamentos sulfidril livres não proteico e a barra cinza os grupamentos sulfidril livres proteico. Painel C - Quantificação de EROs pelas células de GDB 248 expressos em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em amônio e a barra laranja os resultados de amônio/GSH. Painel D - Expressão gênica em tempo real para os genes *GPX*, *GSH1*, *SOD1* e *YAP1* de GDB 248 em galactose/amônio sobre glicose/amônio como condição calibradora. 59
- Figura 3 Efeito do citrato e do glicerol como fontes respiráveis na resposta ao estresse por H_2O_2 em *Dekkera bruxellensis* GDB 248. Painel A - Testes de viabilidade realizados para a levedura GDB 248 em glicose, citrato e glicerol expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar padrão de viabilidade. Painel B - Quantificação de tióis citosólicos expressos em mmol/gCel da levedura GDB 248. A barra azul representa os grupamentos sulfidril totais (proteicos e não proteicos); a barra laranja representa os grupamentos sulfidril livres não proteico; e a barra cinza, os grupamentos sulfidril livres proteico. Painel C - Quantificação de EROs na célula de GDB 248 em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul são os resultados em amônio e a barra laranja em amônio/GSH (C). 61

Figura 4	Influência do nitrato sobre a viabilidade celular da levedura GDB 248 na presença do H ₂ O ₂ . Painei A - Testes de viabilidade realizados para a levedura GDB 248 e JP1 em glicose, como fonte carbono respiro-fermentativa, e galactose, fonte de carbono estritamente respirável, expostas a concentrações crescentes de H ₂ O ₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar o padrão de viabilidade. Painei B - Quantificação de ROS na célula de GDB 248 expressa em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em NO ₃ e a barra laranja os resultados de NO ₃ + GSH, em suas respectivas fontes. Painei C - Expressão gênica em tempo real para os genes <i>GPX</i> , <i>GSH1</i> , <i>SOD1</i> e <i>YAP1</i> de GDB 248 em glicose/nitrato sobre glicose/amônio. Painei D - Expressão gênica relativa em galactose/nitrato sobre galactose/amônio.	64
Figura 5	Perfil de expressão de genes de defesa antioxidante em <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 na presença do H ₂ O ₂ . Painei A - Expressão gênica em tempo real para os genes <i>GPX</i> , <i>GSH</i> , <i>SOD</i> e <i>YAP1</i> em glicose/amônio/H ₂ O ₂ sobre glicose/amônio como condição calibradora. Painei B - Expressão gênica em glicose/nitrato/H ₂ O ₂ sobre glicose/nitrato. Painei C - Expressão gênica galactose/amônio/H ₂ O ₂ sobre galactose. Painei D - Expressão gênica galactose/nitrato/H ₂ O ₂ sobre galactose/nitrato.	66
Figura 6	Efeito do nitrato sobre a viabilidade das células de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 na presença do H ₂ O ₂ em citrato ou glicerol como fontes de C. Painei A - Testes de viabilidade realizados para GDB 248 em glicose e citrato expostas a concentrações crescentes de H ₂ O ₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar o padrão de viabilidade. Painei B - Quantificação de EROs nas células de GDB 248 expressa em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em nitrato e a laranja os resultados de nitrato/GSH.	67
Figura 7	Teste de viabilidade em placa com adição da molécula de Glutathione reduzida (GSH) na presença de glicose (Fonte respiro-fermentativa) ou galactose (Fonte respirável) como fontes de carbono em combinação com amônio ou nitrato como fontes de nitrogênio. A condição de referência para o crescimento apresenta somente a levedura. A referência para o peróxido de hidrogênio foi testado apenas com o agente na condição 0,5 e 1,0mM. A condição referência para o GSH foi utilizado somente contendo o GSH na concentração de 1mM. As concentrações de H ₂ O ₂ foram fixadas em 0,5 e 1,0mM e ambas testadas em concentrações crescentes do GSH de 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM até 1,0 mM.	68

Figura 8	Teste de adaptação de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 ao H₂O₂. As células foram cultivadas em glicose (respiro-fermentativa) ou galactose (respirável), como fontes de carbono, em combinação com amônio ou nitrato como fontes de nitrogênio. Estas foram coletadas na fase exponencial do crescimento e submetidas a um pré-tratamento por 60 minutos com dose subletal de H₂O₂ à 150mM. Em seguida, estas mesmas células foram submetidas a doses crescentes e letais de H₂O₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM). As células sem pré-tratamento foram utilizadas como condição referência para a viabilidade celular.	71
Figura 9	Resposta adaptativa da levedura <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 ao estresse oxidativo sob restrição calórica. As células foram cultivadas em glicose nas concentrações de 2 g/L - painéis A e B (condição referência), 0,5 g/L - painéis C e D, e 0,2 g/L - painéis E e F - como condições sob restrição calórica. Painéis A, C e E - em amônio e painéis B, D e F – em nitrato como fontes de nitrogênio. As células foram coletadas na fase estacionária do crescimento e submetidas a concentrações crescentes de H₂O₂ de 0,5 mM (círculos laranjas), 1,0 mM (círculos cinzas) e 1,5 mM (círculos amarelos) e comparados com o crescimento na ausência de H₂O₂ (círculos azuis).	72
Figura 10	Cinética de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 em meio YNB contendo glicose em amônio ou nitrato, suplementado com rapamicina a 40 ng/ml ou peptídeo inibidor da PKA a 20 µmol, na presença de H₂O₂ a 0,5 mM. As células foram cultivadas em glicose e amônio (Painel A) ou em glicose e nitrato (Painel B) na presença ou ausência de rapamicina. As células foram cultivadas em glicose e amônio (Painel C) ou em glicose e nitrato (Painel C) na presença ou ausência do inibidor da PKA. Os símbolos se referem a condição referência (círculos azuis), tratamento com um inibidor (círculos laranjas), H₂O₂ (círculos verdes) ou H₂O₂ com um inibidor (círculos amarelos).	76
Figura 11	Modelo regulatório propositivo da resposta de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 ao tratamento com H₂O₂ e a relação dessa resposta com as vias de regulação do crescimento celular. GCR: mecanismo de repressão catabólica pela glicose; pep14-22: peptídeo 14-22 miristoilado inibidor da PKA; PKA: proteína quinase A; NCR: mecanismo de repressão catabólica pelo nitrogênio; TOR: quinase do mecanismo de <i>Tolerance To Rapamicin</i>. Os símbolos em preto indicam ativação metabólica. Os símbolos em vermelho indicam inibição metabólica.	79

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1

Tabela 1	Lista de primers desenhados a partir das sequências dos genes envolvidos na proteção celular contra estresse oxidativo em <i>D. bruxellensis</i> GDB 248.	42
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
C	Carbono
DOinicial	Densidade Óptica Inicial
DOfinal	Densidade Óptica Final
GSH	Glutathione reduzida
GPX	Glutathione peroxidase
GRX	Glutarredoxina
GR	Glutathione reductase
g/L	grama/Litro
JP1	Saccharomyces cerevisiae JP1
L	Litro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NAC	N-acetilcisteína
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NCR	Repressão catabólica do nitrogênio
NR	Nitrato reductase
O ₂	Oxigênio
O ₂ • ⁻	Superóxido de Oxigênio
OH•	Radical Hidroxila
PRX	Peroxirredoxina
pH	Potencial Hidrogeniônico
SOD	Superóxido dismutase
TRX	Tiorredoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	ASPECTOS GERAIS DA LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	19
3.2	A LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> COMO CONTAMINANTE INDUSTRIAL	21
3.3	FISIOLOGIA DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	23
3.3.1	Assimilação de Carbono por <i>Dekkera bruxellensis</i>	23
3.3.2	O efeito <i>Crabtree</i> em células de <i>Dekkera bruxellensis</i>	24
3.3.3	A regulação do metabolismo da glicose pela via PKA	25
3.3.4	A assimilação de fontes de nitrogênio	27
3.3.5	A regulação do metabolismo do nitrogênio pela via TOR	30
3.4	OUTROS FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E METABOLISMO DE <i>D. BRUXELLENSIS</i>	32
3.5	ESTRESSE OXIDATIVO	33
3.5.1	Radical ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	35
3.5.2	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	35
3.5.3	Radical Hidroxila ($OH^{\bullet}$)	36
3.6	DEFESA ANTIOXIDANTE	37
3.7	ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	38
3.7.1	Glutathiona (GSH)	38
3.7.2	N-acetilcisteína (NAC)	40
3.8	ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	41
3.8.1	Superóxido dismutase (SOD)	41
3.8.2	Catalase	41
3.8.3	Glutathiona peroxidase (GPX)	42
3.8.4	Glutathiona Redutase (GR)	43

3.8.5	Tiorredoxinas (Trx)	44
3.8.6	Glutarredoxinas (Grx)	45
3.8.7	Peroxirredoxina (Prx)	45
3.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS E MOTIVAÇÃO	43
4	ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> EM ESTRESSE OXIDATIVO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)	47
4.1	INTRODUÇÃO	48
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.2.1	Linhagens, condições de cultivo e reagentes	50
4.2.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao peróxido de hidrogênio	51
4.2.3	4.2.3 Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na tolerância ao H ₂ O ₂	51
4.2.4	Testes de adaptação ao estresse oxidativo	52
4.2.5	<i>Ensaio de restrição calórica</i>	52
4.2.6	Ensaio de proteção celular por glutathione	52
4.2.7	Ensaio de inibição das vias PKA e TOR	53
4.2.8	Determinação do conteúdo de tióis nas células das leveduras	53
4.2.9	Quantificação da Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	54
4.2.10	Análise de expressão gênica por PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	DEKKERA BRUXELLENSIS GDB 248 É MENOS TOLERANTE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DO QUE SACCHAROMYCES CEREVISIAE JP1	57
5.2	A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS SULFIDRILADAS DURANTE O METABOLISMO RESPIRATÓRIO PROTEGE D. BRUXELLENSIS GDB 248 CONTRA H ₂ O ₂	59
5.3	NITRATO POTENCIALIZA A AÇÃO TÓXICA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM DEKKERA BRUXELLENSIS GDB 248	65

5.4	A PRESENÇA DO ANTIOXIDANTE GSH AUMENTA A SENSIBILIDADE DE D. BRUXELLENSIS GDB 248	70
5.5	A RESPOSTA ADAPTATIVA A ESTRESSE OXIDATIVO NÃO É DISPARADA EM D. BRUXELLENSIS GDB 248	72
5.6	A RESTRIÇÃO CALÓRICA NÃO TORNA D. BRUXELLENSIS GDB 248 MAIS RESISTENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO	74
5.7	A RESPOSTA DE D. BRUXELLENSIS AO ESTRESSE OXIDATIVO DEPENDE DA ATIVIDADE DAS VIAS PKA E TOR	76
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* apresenta significativa adaptação ao processo industrial de produção de etanol combustível. Esse sucesso adaptativo parece ser devido em parte a capacidade desta espécie de utilizar nutrientes para seu crescimento que se apresentam em concentrações limitadas no substrato e de sua capacidade de utilizar fontes de nitrogênio que não são utilizadas por outras leveduras. Um exemplo desta característica é o uso de nitrato, presente no caldo da cana em baixas concentrações, e proveniente do metabolismo das bactérias do solo e/ou fertilizantes de campo, o qual pode ser utilizado por *D. bruxellensis* com pouca competição por outras leveduras. Além disso, sua presença nesse ambiente industrial indica que esta levedura disporia de mecanismos moleculares capazes de proteger suas células contra os efeitos nocivos de diferentes formas de estresse presentes naquele ambiente. Dentre as defesas celulares contra essas formas de estresse, o mecanismo de resposta a estresse oxidativo tem papel relevante na proteção das células pela presença de moléculas oxidantes presentes no ambiente, ou mesmo produzidos pelo próprio metabolismo. No caso da fermentação alcoólica, esses agentes oxidantes estariam presentes no melaço da cana de açúcar no caso de etanol de primeira geração, ou no hidrolisado de biomassas lignocelulósicas no caso do etanol de segunda geração. Nesse contexto, faz-se necessário se as células dispõem de mecanismos que tornariam as células capazes de tolerar estresse oxidativo.

Como modelo dessa resposta, o presente trabalho utilizou o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como possível gerador de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estudou a tolerância celular conectada com a produção de moléculas antioxidantes e com o padrão de expressão de genes que atuam no mecanismo de defesa a estresse oxidativo em organismos-modelo como *Saccharomyces cerevisiae*. Foram exploradas as respostas dependendo do tipo de fonte de carbono e de nitrogênio e o efeito da inibição dos dois maiores mecanismos de regulação metabólica do carbono (via da proteína quinase A) e do nitrogênio (via da proteína quinase TOR). Os resultados obtidos revelaram aspectos importantes da regulação e ativação da resposta a estresse oxidativo em *D. bruxellensis*, que diferem do que se conhece para *S. cerevisiae*, e que abre as perspectivas para a utilização adequada desta levedura para fins biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar o metabolismo oxidativo em *Dekkera bruxellensis*, identificando os aspectos da resposta celular a estresse oxidativo como ponto fundamental da defesa antioxidante.

2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito de diferentes estados metabólicos da levedura *Dekkera bruxellensis* na defesa celular contra estresse oxidativo em meios contendo diferentes combinações de fontes de carbono (glicose, galactose, citrato ou glicerol) e de nitrogênio (amônio ou nitrato);
- Determinar o nível de estresse oxidativo nas células cultivadas nas condições acima pela quantificação das espécies reativas de oxigênio, conteúdo de tióis, medida do mecanismo de resposta adaptativa a estresse oxidativo;
- Determinação do efeito da restrição calórica sobre o metabolismo oxidativo, longevidade celular em meios contendo diferentes combinações de fontes de carbono e de nitrogênio;
- Analisar o perfil de regulação da expressão de genes chaves na resposta a estresse oxidativo na defesa antioxidante de *Dekkera bruxellensis* nas condições acima citadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ASPECTOS GERAIS DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS*

O termo *Brettanomyces* foi introduzido pela primeira vez em 1904 para descrever uma levedura, isolada por Hjelte Claussen, utilizada na produção de cerveja inglesa (Agnolucci et al., 2017). Em 1920, *Brettanomyces* passa a ser reconhecido como gênero, quando leveduras foram isoladas da cerveja Lambic, um estilo de cerveja fabricado tradicionalmente na Bélgica (HENSCHKE et al. 2007). Um pouco mais tarde, em 1930, essa levedura foi detectada pela primeira vez em vinho (Krumbholz e tauschenoff, 1933).

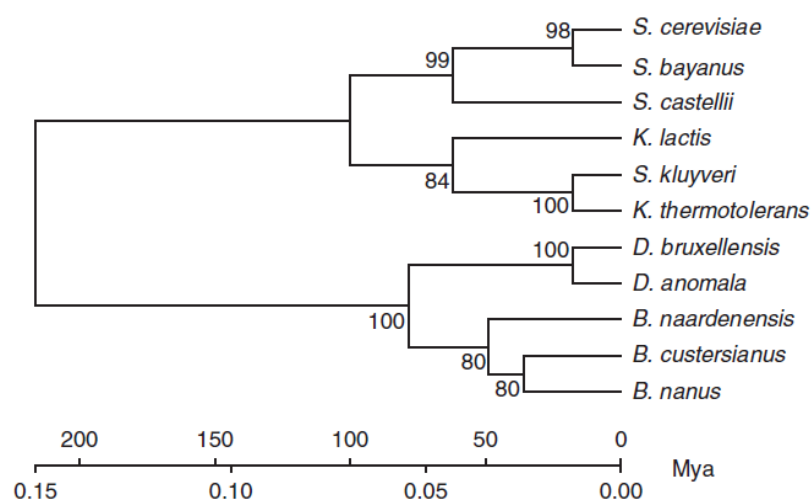
Em 1960, van der Walt e van Kerken descreveram a formação de esporos em linhagens de leveduras do gênero *Brettanomyces*, sendo proposto um novo gênero para classificar esta forma da espécie (Van Der Walt, 1964). Assim, enquanto sua forma anamórfica, com reprodução assexuada e não esporulada, é classificada como *Brettanomyces*, sua forma teleomórfica, com reprodução sexuada e esporulada, é classificada no gênero *Dekkera*. A distinção entre *Dekkera* e *Brettanomyces* ainda não é bem elucidada, pois técnicas atuais de biologia molecular não foram capazes de detectar diferenças sistemáticas entre as formas e por isso ainda são utilizadas como sinônimos (Oelofse et al, 2008). Embora ambos os nomes sejam válidos, o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, exige que somente um único seja utilizado, como o nome *Brettanomyces*, por ser mais conhecido nas indústrias de alimentos e bebidas, é comumente mais usado (Steensels et al., 2015). Contudo, apesar disto, o nome do gênero *Dekkera* ainda é bastante difundido e será utilizado neste trabalho para manter a linha de estudos que vem sendo realizados com os isolados provenientes da produção de etanol combustível.

Atualmente, o gênero *Dekkera/Brettanomyces* inclui 5 espécies anamórficas (*B. custersianus*, *B. naardensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* e *B. bruxellensis*) e 2 formas teleomórficas (*D. anomala* e *D. bruxellensis*) (Pinto et al., 2020). A espécie *D. bruxellensis* tornou-se a principal representante deste gênero (Van Der Walt, 1984), devido sua elevada presença em ambientes de fermentação industrial, tornando bastante interessante se entender os mecanismos de sobrevivência e crescimento naqueles ambientes industriais. Nesse contexto, várias características importantes já

foram descritas, como por exemplo, a capacidade de consumir diversas fontes de carbono e nitrogênio, tolerar a presença de ácidos e metabolizar ácidos hidroxicinâmicos a compostos voláteis (Blomqvist et al., 2011; Tiukova et al., 2014). Esse perfil comportamental aumentou o interesse por parte de alguns grupos de pesquisa pelo mundo em estudar principalmente a espécie *D. bruxellensis*, devido seu elevado potencial em contribuir para distintas fermentações industriais (De Barros Pita et al., 2019; Roach e Borneman, 2020).

A taxonomia atual desta levedura é dividida em: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetacea, Gênero Dekkera (Barnett et al., 1990). *Dekkera bruxellensis* está inserida na família Saccharomycetacea, como um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*. Análises evolutivas realizadas através de estudos com rDNA mitocondrial 15S e nuclear 26S indicam que as leveduras *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* ramificaram de um ancestral comum há cerca de 200 milhões de anos (Figura 1) e com isso adquiriram características filogeneticamente distantes (Rozpedowska et al, 2011). Apesar disto, desenvolveram adaptações em comum, possivelmente em resposta a pressões seletivas semelhantes, que permitem sobreviver em ambientes fisiologicamente desafiadores (como mosto de fermentação e vinho maduro), além da capacidade de produzir etanol em elevados níveis de rendimento.

Figura 1 - Arvore filogenética das espécies do gênero *Dekkera* baseada na análise de restrição da sequência de DNA ribossomal 26S e nuclear 26S (Mya: milhões de anos).

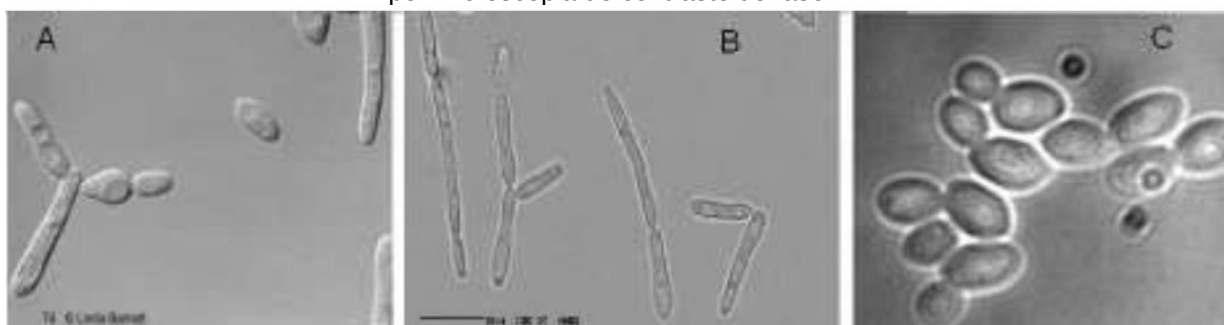


Fonte: Rozpedowska et al., 2011.

Assim como *S. cerevisiae*, *D. Bruxellensis* também produz, acumula e consome eficientemente etanol e ácido acético. Ambas as espécies são consideradas *Crabtree* positivas, ou seja, produzem etanol mesmo na presença de oxigênio, e são *petit* positivas, ou seja, podem sobreviver sem DNA mitocondrial (Woolfit et al., 2007; Piskur et al., 2012). Vale salientar, por exemplo, que a levedura *D. bruxellensis* utiliza sacarose em aerobiose com menor eficiência e cresce mais lentamente que *S. cerevisiae*. O grande problema é a assimilação mais lenta dos açúcares, o qual resulta em baixas produtividades volumétricas de etanol (Basílio et al., 2008; Leite et al., 2012; Pereira et al., 2012). Contudo, diferentes estudos mostraram que *D. bruxellensis* é capaz de alcançar rendimentos na produção de etanol semelhantes àqueles atingidos por *S. cerevisiae*, além da capacidade em assimilar uma ampla variedade de fontes alternativas de carbono (Conterno et al., 2006; Blomqvist et al., 2010., Rozpedowska et al., 2011; Leite et al., 2016).

A morfologia geral de suas células ao microscópio óptico é bastante diversificada e pode alterar de acordo com a linhagem, meio de cultura e estresse a qual esteja submetida. Sua forma pode apresentar-se elipsoidal a esférica, muitas vezes ogivais, ou ainda cilíndrica a alongada (Figura 2), além da formação de pseudomicélio (Van Der Walt, 1964).

Figura 2 - Representação por imagem de linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. A – Linhagem CBS 74; B – Linhagem CBS 2499; C – Linhagem Industrial GDB 248. As células foram observadas por microscopia de contraste de fase.



Fonte: Figura adaptada de Leite, 2012.

3.2 A LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* COMO CONTAMINANTE INDUSTRIAL

Dekkera bruxellensis é uma levedura industrial considerada por muito tempo apenas como uma espécie contaminante nos processos de fermentação industrial,

principalmente associada com lactobacilos (De Barros Souza et al., 2012; Bassi et al., 2018). Embora seja uma espécie de levedura encontrada predominantemente em vinho, ela também é encontrada em outros processos industriais fermentativos, como a produção de cerveja e etanol combustível (De Souza Liberal et al. 2007; Basílio et al., 2008; Oelofse et al. 2008). Isso fez com que trabalhos fossem realizados no sentido de se encontrar moléculas que pudessem combater sua presença em dornas de fermentação, tais como polihexametil bisguanida (Elsztein et al., 2008), combinação de etanol em baixo pH (Bassi et al., 2013) e metabisulfito (Bassi et al., 2015). Sua posição como levedura contaminante decorre da deterioração de cervejas (com exceção da lambic) e vinhos pela alta produção de fenóis voláteis considerados “*off-flavours*” (moléculas que agregam sensações desagradáveis às bebidas) além da alta produção de ácido acético (Shantha Kumara et al 1993; Heresztyn 1986a, 1986b; Sponholz, 1993; Felipe-Ribeiro et al., 2018).

Apesar do exposto acima, de fato, *D. bruxellensis* é bastante aproveitada para contribuir com as características florais ou frutadas em cervejas, por exemplo, e isto acontece devido sua capacidade de produção e liberação de ácido acético, álcoois superiores e vários ésteres, como 2-feniletanol, acetato de etila, caprato de etila, caprilato de etila e lactato de etila, (Verachtert et al. 1992; De Souza Liberal et al., 2012; Crauwels et al. 2015a; Parente et al. 2015; Basso et al. 2016; Lima et al., 2018).

Adicionalmente aos processos industriais para a produção de bebidas, essa levedura é muito presente em dornas de fermentação para a produção de etanol combustível (de Souza Liberal et al., 2007; Passoth et al., 2007; Beckner et al., 2011). Em diversas destilarias do Nordeste do Brasil, a espécie *D. bruxellensis* mostrou ser a principal contaminante encontrada nos sistemas de fermentação, e demonstrou ainda, que essa subpopulação chega a substituir a população majoritária de *S. cerevisiae*, mesmo em processo de troca de biomassa total repetida (de Souza Liberal et al, 2007; Basílio et al, 2008; de Barros Pita et al, 2011). Silva (1994) apresentou elevada instabilidade do fermento inicial e detectou a contaminação por *D. bruxellensis* no processo de produção de etanol contínuo, observando alta competição dessa espécie no ambiente fermentativo, resultando, em oito dias de operação, o aumento de 62% para 96% da contagem total da levedura contaminante.

A rápida adaptação adquirida por *D. bruxellensis* parece estar relacionada a capacidade desta espécie de utilizar nutrientes para seu crescimento que se apresentam em baixas concentrações no substrato e de sua capacidade de utilizar

fontes de nitrogênio que não são utilizadas por outras leveduras, como por exemplo a assimilação de nitrato. Quando as fontes preferenciais são consumidas, o nitrato, fonte presente no caldo da cana em baixas concentrações, gera uma vantagem adaptativa de *D. bruxellensis* sobre *S. cerevisiae*, que é incapaz de consumir essa fonte de nitrogênio (de Barros Pita et al., 2011; de Barros Pita et al., 2013). Contudo, na produção de etanol combustível, quando a contagem celular de *D. bruxellensis* encontram-se alta, observa-se em algumas unidades industriais uma diminuição da produtividade de etanol e consequentemente significativo prejuízo industrial, devido ao maior tempo necessário para a conversão de açúcar em etanol (de Souza Liberal et al, 2007).

D. bruxellensis possui grande potencial aplicável, pois, mesmo com menor produtividade, apresenta capacidade de produzir etanol em elevados rendimentos (de Barros Pita et al, 2011; Leite et al, 2013; Penã-Moreno et al., 2019). Desta forma, mesmo em contaminação instalada no processo fermentativo por *D. bruxellensis* no ambiente industrial é mais viável a utilização do seu potencial industrial à tentativa de eliminação da espécie. Isto torna o conhecimento sobre seu metabolismo importante para complementar o quadro sobre funcionamento dos mecanismos de controle da assimilação, metabolização de diferentes fontes visando identificar perfis e condições ambientais que favoreçam altos rendimentos e produtividade (de Barros Pita et al, 2011, 2013; Leite et al., 2013; Galafassi et al., 2013). Essa levedura possui algumas vantagens adaptativas que são atraentes para sua aplicação industrial na produção de etanol, tais como tolerância a baixo pH e a elevada concentração de etanol, embora a combinação dessas duas variáveis seja deletéria para alguns isolados (Bassi et al., 2013), (Steensels et al., 2015).

Além disso, essa levedura possui potencial para produção de etanol a partir de pentose, embora com rendimentos muito baixos (Codato et al., 2018; Da Silva et al., 2020). Desta maneira, torna-se bastante interessante para a produção de etanol de segunda geração, aquele produzido a partir de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas, como bagaço de cana de açúcar ou resíduos agrícolas.

3.3 FISILOGIA DE *DEKKERA BRUXELLENSIS*

3.3.1 Assimilação de Carbono por *D. bruxellensis*

O conjunto de condições e recursos que permitem diversas espécies de leveduras sobreviver a diferentes ambientes deve-se principalmente a sua capacidade em assimilar diferentes fontes de carbono, adaptando-se facilmente a variados habitats. Estudos mostram que a depender das fontes de isolamento isso gere diferenças metabólicas, no que se refere a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Crauwels et al., 2015). A levedura *D. bruxellensis* é capaz de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio como os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e dissacarídeos, como sacarose, maltose, trealose, amônio e aminoácidos. Além disso, apresenta a capacidade de consumir nutrientes não utilizados por *S. cerevisiae*, tais como: celobiose (dissacarídeo contido em substratos para produção de etanol de segunda geração), arabinose (pentoses presentes em hidrolisados hemicelulósicos) e nitrato (Conterno et al., 2006; Rozpedowska et al., 2011; de Barros Pita et al., 2011; Crauwels et al., 2015; Da Silva et al., 2019; Da Silva et al., 2020). A assimilação dessa gama de fontes apresenta grande relevância industrial por fazerem parte da composição de substratos, como o caldo-de-cana e o melaço, e por isso, constituíram papel importante no cenário da fermentação industrial (de Souza Liberal et al., 2007; Pereira et al., 2012, 2014).

3.3.2 O efeito *Crabtree* em células de *D. bruxellensis*

No ambiente industrial, diversas características precisam ser relevantes para que uma levedura seja considerada boa produtora de etanol. As leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* apresentam a capacidade de fermentar açúcar para produzir etanol mesmo em condições aeróbicas, quando há excesso de açúcar no meio. Este efeito é chamado *Crabtree* positivo, e confere as leveduras diferentes características genéticas que resultaram em uma estratégia evolutiva importante denominada “*make-accumulate-consume*” (“fazer-acumular-consumir”). Neste fenômeno, as leveduras apresentam grande capacidade de assimilar hexoses e de converter esses açúcares a etanol mesmo em aerobiose para re-oxidação do NADH glicolítico e para impedir o crescimento de micróbios concorrentes (fazer); assim, o etanol se acumula no ambiente e as células são resistentes aos seus efeitos tóxicos (acumular); e finalmente esse etanol pode ser utilizado como fonte de carbono e energia pela via respiratória quando o açúcar do meio é exaurido (consumir) (Rozpedowska et al., 2011). O efeito *crabtree* positivo é explicado no modelo *S.*

cerevisiae pelo excesso de NADH produzido pela via glicolítica (Pronk et al., 1996). Este “gargalo” ou “marca-passo” provoca uma saturação da capacidade respiratória, fazendo com que o piruvato seja direcionado para a fermentação alcoólica. Sendo assim, altos fluxos glicolíticos em *S. cerevisiae* são invariavelmente acompanhados por fermentação alcoólica, mesmo na presença de oxigênio. Isso implica que, particularmente em altas concentrações de glicose, a enzima piruvato descarboxilase se torna elemento central para re-oxidação final do NADH na tentativa de solucionar esse problema redox da célula (Procházka et al., 2010; Rozpedowska et al., 2011). Essa é uma característica quase que restrita ao conjunto de leveduras que compõem o chamado grupo *Cerevisiae* senso estrito (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. eubayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. cariocanus*, *S. manacensis* e *S. carlsbergensis*) envolvido na produção industrial de pães e de bebidas fermentadas e destiladas. Nesse grupo, se enquadram algumas espécies de *Dekkera/Brettanomyces*, com destaque para *D. bruxellensis*. No entanto, apesar de seu fenótipo *Crabtree* positivo, essa espécie tem uma característica diferente pela tendência em produzir biomassa e acetato, os quais são resultados do metabolismo oxidativo (Leite et al., 2013).

3.3.3 A regulação do metabolismo da glicose pela via PKA

Inúmeros estudos mostram que praticamente todas as células apresentam mecanismos genéticos e habilidade em responder a presença de glicose por esta ser a fonte de carbono mais abundante na natureza (Santangelo, 2006). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a sinalização da proteína G, em particular através da via Ras/cAMP/PKA, é o principal componente celular que participam de eventos em resposta à glicose em mecanismos de indução e repressão reguladas pela sua disponibilidade no meio (Galello et al., 2014).

O papel da proteína quinase A (PKA) é exercido através fosforilação de diferentes proteínas-alvo como quinases, fosfatases e enzimas metabólicas. A PKA de *S. cerevisiae* é uma holoenzima tetramérica que pertence a uma família de enzimas de fosforilases proteicas de resíduos de serina/treonina cuja atividade é dependente dos níveis celulares de AMP cíclico (cAMP) (Thevelein e de Winde et al., 1999). A PKA é ativada pela ligação do AMPc às subunidades reguladoras (Kraakman et al., 1999). A subunidade reguladora de ligação de cAMP é codificada por um único gene *BCY1*,

enquanto as subunidades catalíticas são codificadas pelos genes *TPK1*, *TPK2* e *TPK3* (Toda et al. 1987). Após a ligação do AMPc em Bcy1p ocorre a dissociação das subunidades catalíticas, as quais são capazes de promover a fosforilação diferentes proteínas (Ptacek et al., 2005). O AMPc é um mensageiro secundário produzido a partir da conversão do ATP pela enzima adenilato ciclase. Esta enzima pode ser ativada pela Ras1p e Ras2p ou pelo sistema receptor acoplado a proteína G, após estímulo pela presença de glicose (Winderickx et al., 1984; Zaman et al., 2008; Plank, 2020). Uma vez ativada, a via de sinalização AMPc-PKA em *Saccharomyces cerevisiae* assume o controle de muitos processos associados a fermentação, percepção de nutrientes, regulação do crescimento celular, entrada na fase estacionária e resposta a estresse (Galello et al., 2014; Gancedo, 2008; Santangelo, 2006).

A adição de glicose ou de outros açúcares facilmente fermentáveis em meio com escassez de fontes de carbono ou em células de levedura crescendo em fontes de carbono não fermentáveis promove um aumento no nível intracelular de AMPc, o qual dispara a atividade da PKA. Em células de levedura, uma das vias regulatórias mais conhecida e estudada é a via principal de repressão catabólica pela glicose (Glucose Catabolite Repression – GCR) (Carlson, 1999). O maior efeito dessa via é reprimir a respiração durante o crescimento celular em altos níveis de glicose (>de 5 mM). Este efeito é acompanhado por repressão de genes envolvidos no ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e diminuição de genes responsáveis pela expressão de enzimas envolvidas na resposta geral ao estresse, como os fatores de transcrição Msn2/4p. Ou seja, estes eventos mostram que o aumento da atividade da PKA inibe a resposta ao estresse em abundância de nutrientes (Thevelein, 1994; Thevelein e de Winde et al., 1999; Plank, 2020).

Além disso, este efeito de repressão também é responsável pela inibição do metabolismo de outros açúcares ou fontes de carbono que estejam presentes no meio (Pelicano et al., 2006). No único trabalho publicado sobre a via ativação da via PKA em *D. bruxellensis*, Leite et al (2016) mostrou que a súbita adição de glicose ao meio não exerce papel tão indutor como é observado em *S. cerevisiae*. Isto porque o nível de ativação da via PKA já é alto nesta levedura mesmo na ausência de glicose. Isso indica que o controle exercido por PKA deve diferir em aspectos importantes do metabolismo entre essas duas espécies.

3.3.4 A assimilação de fontes de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento indispensável ao metabolismo celular devido ao seu papel constitutivo em diversos componentes celulares como aminoácidos e ácidos nucléicos. As leveduras são capazes de usar uma grande variedade de compostos como fonte de assimilação incluindo amônia, aminoácidos, ureia e bases nitrogenadas (Conterno et al., 2006; Godard et al., 2007). Desta forma, a disponibilidade de compostos nitrogenados e o tipo de fonte de nitrogênio presente no meio é capaz de afetar mecanismos regulatórios e direcionar o aumento/diminuição na expressão de genes como, por exemplo, os que fazem parte da via glicolítica e do metabolismo do nitrogênio, os de controle do ciclo celular, permitindo a assimilação de fontes que supram as necessidades mais rapidamente (De Barros Pita et al., 2013; Siverio, 2002; Barnett et al., 1990).

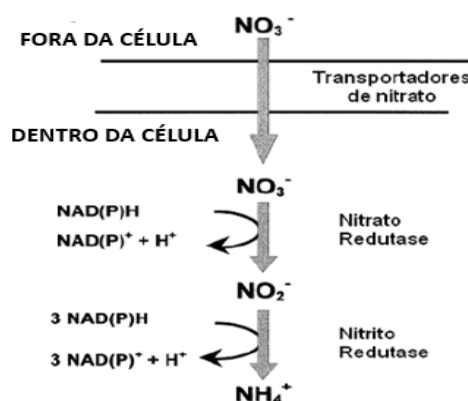
Apesar do nitrato ser a fonte de nitrogênio mais abundante disponível na natureza, esta fonte necessita de reações adicionais e para ser reduzida a amônio demanda elevada custo energético e prejuízo ao crescimento (Siverio, 2002; Conterno et al., 2006; Godard et al., 2007). Desta forma, apesar das leveduras assimilarem diversas fontes de nitrogênio, a maioria dos organismos utilizam mais facilmente e preferencialmente o amônio (Siverio, 2002).

Os compostos nitrogenados podem ser classificados para leveduras de acordo com a facilidade de assimilação e as taxas de crescimento em: fontes preferenciais ou primárias (amônia, glutamato, glutamina) e fontes não-preferenciais ou secundárias (leucina, prolina e metionina) (Magasanik, 2003; Boer et al., 2007; Godard et al., 2007; Parente et al., 2018). A justificativa para esta classificação, baseia-se na preferência das leveduras por substratos que propiciem o melhor desenvolvimento do seu metabolismo através de um mecanismo de regulação chamado repressão catabólica de nitrogênio (NCR). Este mecanismo NCR tem como função assegurar que as células utilizem seletivamente fontes de nitrogênio preferenciais quando disponíveis, e na ausência, cause a desrepressão geral de genes regulados por NCR, permitindo que as células passem a usar as fontes alternativas de nitrogênio, ou seja, fontes não preferenciais (Crepin et al, 2012; De Barros Pita et al., 2013). Contudo, vale salientar, que esta classificação para fontes de nitrogênio não é absoluta, e os efeitos de repressão podem variar significativamente entre linhagens de diferentes leveduras e condições de crescimento (Parente et al., 2018).

Poucas espécies de gêneros diferentes como por exemplo *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Dekkera* são capazes de metabolizar fontes de nitrogênio como o nitrato e o nitrito e, por isso, são classificadas como não preferenciais (Siverio, 2002). Para a assimilação, leveduras desenvolveram sistemas regulatórios complexos no intuito de adaptar a maquinaria enzimática a presença dessas fontes. Estudos moleculares permitiram a identificação de cinco genes (*YNT1*, *YNR1*, *YNI1*, *YNA1* e *YNA2*) envolvidos na metabolização do nitrato em *D. bruxellensis* (Ávila et al, 2002; Conterno et al. 2006). Dados recentes mostram que diversos isolados de *D. bruxellensis* provenientes de destilarias de etanol do nordeste do Brasil apresentam esse fenótipo nitrato-positivo justamente por apresentarem todos os cinco genes acima (De Barros Pita et al., 2011, 2013b; Da Silva et al., 2019).

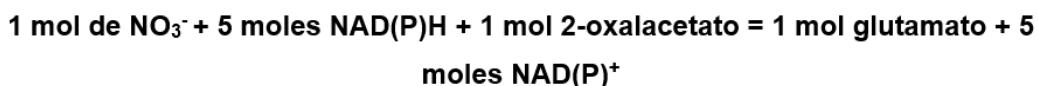
Sabe-se que a obtenção de compostos nitrogenados nas células pode ocorrer, de maneira geral, por duas formas: 1) redução de fontes nitrogenadas à NH_4^+ ; e 2) assimilação direta de NH_4^+ ou glutamato presentes no meio (CONRAD et al 2014). Células de *D. bruxellensis*, assim como em outros organismos assimiladores de nitrato (NO_3^-), o NO_3^- entra na célula através de um transportador de alta afinidade (*YNT1*) e é catalisado pelo nitrato redutase (*YNR1*) que requer diferentes cofatores (molibdopterina, heme-ferro e FAD) e utiliza um mol de NADPH como doador de elétron para redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) (HIPKIN, 1989). O segundo passo é a redução de NO_2^- a NH_4^+ catalisada pela enzima nitrito redutase (*YNI1*), a qual necessita do consumo de quatro moles de NAD(P)H como doador de elétrons. Todo o processo envolve oito elétrons e o consumo de quatro moles de equivalentes redutores NAD(P)H, ao final da reação (Figura 3) (Ávila et al 2002; Siverio, 2002).

Figura 3 - Via de assimilação do nitrato em fungos. O nitrato é transportado do meio para o citosol onde é reduzido a amônio em duas reações sucessivas catalisadas, respectivamente, por nitrato e nitrito redutase.



Fonte: Adaptado de Siverio (2002).

Do ponto de vista energético, este processo torna a assimilação bastante custosa para a célula, devido ao elevado consumo de equivalentes redutores. Além disso, existe o gasto de mais um mol de NAD(P)H para a fixação do amônio em glutamato a partir de 2-oxoglutarato pela glutamato desidrogenase, tornando a equação global da assimilação metabólica do nitrato da seguinte forma:



Genes que codificam proteínas envolvidas na assimilação de nitrato são induzidas por nitrato e submetidas à repressão catabólica do nitrogênio. Em *D. bruxellensis*, a assimilação do nitrato pode acontecer tanto isoladamente, quando o nitrato for a única fonte de nitrogênio, como por co-assimilação, quando as duas fontes (nitrato e amônio) forem disponibilizadas justamente no meio de cultura (de Barros Pita et al., 2011). Este fenômeno de assimilação foi possível pelo fato que os três genes estruturais *YNT1*, *YNR1* e *YNI1* serem expressos mesmo quando o amônio estava presente, mostrando que não são reprimidos na presença do amônio, mas sofrem diferentes níveis de regulação (de Barros Pita et al., 2011).

Desta forma, foi concluído que a expressão destes genes depende mais sobre a disponibilidade do que a fonte de nitrogênio e que qualquer nível de expressão pode garantir um certo nível de enzima para metabolizar nitrato em nitrito. Essas diferenças metabólicas levaram a formulação da hipótese de que as diferentes vias e fatores relacionados ao metabolismo das fontes de carbono, bem como da utilização das diversas fontes de nitrogênio, refletem vantagens adaptativas a *D. bruxellensis* em diferentes nichos ecológicos, principalmente em relação a *S. cerevisiae* que não possuem a capacidade de assimilar esse nutriente (Siverio, 2002; de Barros Pita et al., 2011, 2013; Galafassi et al., 2013).

Além disso, o estudo recente realizado por Peña-Moreno et al (2019) comprova, definitivamente, que *D. bruxellensis* é capaz de produzir etanol com o mesmo rendimento que *S. cerevisiae* na ausência de oxigênio, o que é bastante incrementado pela presença de nitrato no substrato. O nitrato também promove maior taxa de crescimento nesta condição, por aumentar a demanda por ATP promovendo aumento do fluxo glicolítico. Em conjunto, esses achados explicam o sucesso de *D. bruxellensis*

no ambiente industrial, bem como reforçam seu potencial para outros processos biotecnológico.

3.3.5 A regulação do metabolismo do nitrogênio pela via TOR

Todos os organismos vivos sentem e respondem a sinais emitidos pelos níveis nutricionais para adaptar sua fisiologia e adotar decisões de desenvolvimento apropriadas para promover a sobrevivência. Em organismos eucarióticos que variam de leveduras a humanos, o controle do crescimento celular em função da disponibilidade e da metabolização das fontes de nitrogênio do meio envolve a via de sinalização TOR (Target of Rapamicy) (Rohde et al, 2008). A presença no meio de cultura de fontes preferenciais de nitrogênio é identificada por meio de sensores de membrana ativando os componentes desta via, para induzir a expressão dos genes relacionados ao crescimento celular, ativando processos anabólicos como síntese de proteínas, biogênese de ribossomo e inibindo processos catabólicos como autofagia (Couso et al., 2019). Sendo assim, a via TOR consiste em um regulador global que envolve diversos componentes centrais da sinalização representadas pelas proteínas quinases TOR. As quinases TOR são membros da superfamília da 3-fosfatidil inositol (PI-3K) quinase, evolutivamente conservadas, identificadas primeiramente em leveduras como alvos do agente antifúngico rapamicina, que também possui atividade imunossupressora em humanos (Loewith et al., 2002).

A versatilidade das quinases do complexo TOR estar envolvida em uma ampla gama de respostas celulares decorre de sua capacidade de se associar fisicamente com outras proteínas e assim coordenar funcionalmente diversas vias de sinalização (Rohde et al, 2008). As leveduras possuem genes codificadores das proteínas dos complexo 1 (TORC1) e do complexo 2 (TORC2), as quais formam complexos multiproteínas funcionalmente e estruturalmente distintos (Yerlikaya et al 2015). De um lado, TORC1, sensível a rapamicina, regula todos os processos temporais de crescimento celular através de uma cascata de sinalização que regula a transcrição, tradução, consumo de nutrientes, biogênese dos ribossomos e a autofagia; por outro lado, TORC2, insensível à rapamicina, é responsável por controlar aspectos espaciais do crescimento, como a organização da actina, endocitose e biossíntese lipídica (Virgilio e Loewith, 2006; Yerlikaya et al, 2015; Picazo e Molin, 2021). Em *S. cerevisiae* a atividade do complexo TORC1 é afetada pelo macrolídeo lipofílico rapamicina,

Neste contexto, quando uma fonte de nitrogênio preferencial se torna escasso, ou na presença de rapamicina, mesmo com uma fonte preferencial, Gln3p é defosforilado e entra no núcleo para promover a transcrição dos genes NCR, os quais são importantes no metabolismo de fontes secundárias de nitrogênio (Beck e Hall, 1999; Crespo e Hall, 2002; Conrad et al., 2014). Sendo assim, a atividade de TORC1 atua diretamente proporcional a disponibilidade de nitrogênio, havendo diminuição da atividade com a falta de nitrogênio preferencial e aumento na presença do mesmo (Rodkaer e Faergeman, 2014; Molinet et al., 2019).

Apesar da literatura mostrar bastante informação a respeito da regulação do metabolismo do nitrogênio pela via TOR na levedura *S. cerevisiae*, existem poucas evidências sobre as consequências da inibição do complexo TORC1 na fisiologia de *D. bruxellensis*, especificamente quando se avalia o metabolismo de assimilação de nitrato, característica peculiar desta levedura (Peña-Moreno et al., 2020).

3.4 OUTROS FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E METABOLISMO DE *D. BRUXELLENSIS*

No ambiente industrial, as células de levedura são expostas a diferentes condições de estresse, desde hiper-osmolaridade, quando as células são introduzidas nas dornas juntamente com o substrato contendo sacarose entre 120 e 160 g.L⁻¹, passando por estresse térmico e etanólico ao longo da fermentação, até estresse oxidativo quando as células são recicladas nos pré-fermentadores que recebem aeração ou microaeração e pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Todas essas etapas influenciam diretamente na viabilidade e na capacidade fermentativa da população de células ao longo dos ciclos do processo. Por conta disso, linhagens que apresentam traços fisiogenômicos mais favoráveis devem apresentar maior adaptabilidade, o que deve explicar, ao menos em parte, a grande dinâmica populacional observada nas destilarias do Brasil (Silva-Filho et al 2005; De Souza Liberal et al., 2007).

Dentre os tipos de estresse industrial que podem comprometer a fisiologia das leveduras, o estresse oxidativo se destaca pela interferência na disponibilidade da capacidade redutora representada por moléculas do tipo glutational, NAD(P)H e tiorredoxinas. Além disso, Aguilar-Uscanga e colaboradores (2003) observaram que a concentração de oxigênio presente no sistema de cultivo apresenta um efeito sobre a

direção do substrato na drenagem para a produção de etanol ou ácido acético. Desta forma, quanto maior a disponibilidade de oxigênio, as células de *D. bruxellensis* tendem a direcionar mais carbono para a produção de ácido acético do que para etanol. Em leveduras, o ácido acético pode ser produzido a partir da oxidação do acetaldeído, a partir do piruvato, produto final da glicólise. Quando produzido em altas concentrações, pode interferir no crescimento e na capacidade fermentativa das células de *D. bruxellensis* (Yahara et al., 2007). Blomqvist e colaboradores (2011) observaram que as células de *D. bruxellensis* produziram quantidades inferiores a 1g de ácido acético por litro utilizando cultivos contínuos e com limitação de oxigênio (5% de oxigênio dissolvido), quantidade que não afeta o crescimento leveduras *D. bruxellensis* ou *S. cerevisiae* nos processos de fermentação indústria.

Bradam e colaboradores (2007) avaliaram a influência da temperatura sobre a fermentação, formação de metabólitos e taxa de crescimento da linhagem de *D. bruxellensis* e foi observado que, na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, demonstrou uma faixa de crescimento segura apresentando, praticamente, a mesma formação de biomassa. Contudo, temperaturas próximas a 35°C provocou uma queda de 65% na formação de biomassa e de 40% na viabilidade celular para a linhagem por eles testada. Blomqvist et al. (2011) mostrou que a faixa de pH ácido (3 a 5) em combinação com variações de temperatura (25 a 37°C) não afetaram os parâmetros de taxa de crescimento e rendimento em etanol de uma linhagem industrial de *D. bruxellensis*, concluindo que *D. bruxellensis* resiste a possíveis variações as condições ambientais. No entanto, a combinação de baixo pH com a presença de etanol pode afetar negativamente a fisiologia desta levedura (Bassi et al., 2013).

3.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Durante o processo de fermentação, as leveduras enfrentam várias formas de estresse que podem afetar de alguma maneira a produção de etanol (ADITIYA et al., 2016). A levedura *S. cerevisiae* sofre várias tensões durante o processo industrial como a elevada concentração de etanol, altas temperaturas, presença elevada de inibidores, induzindo o acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) nas células (Qiu e Jiang, 2017; Benjaphokee et al., 2012). Durante a produção de cerveja, por exemplo, as leveduras devem ser capazes de responder adequadamente a variações de pH, níveis de osmolaridade, elevadas concentrações de etanol, além de elevadas

condições de oxigenação que podem afetar os rendimentos de produção (Gibson et al., 2007).

Em condições fisiológicas, as EROs são produzidas por uma ampla variedade de processos biológicos e geradas por todos os organismos aeróbios, principalmente, através da fosforilação oxidativa durante a respiração mitocondrial. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas químicas altamente instáveis, com propriedades distintas e extremamente reativas, formadas a partir da ativação ou derivadas dos produtos da redução incompleta do oxigênio molecular (O_2) (Davies, 1995).

As EROs são reconhecidas por atuarem em um papel paradoxal, podendo desempenhar funções prejudiciais e benéficas. Em níveis moderados, são úteis na manutenção da homeostase oxidativa celular e propagação de vias de sinalização celular, modulando direta ou indiretamente a atividade de proteínas através da oxidação de resíduos de cisteína específico (Hamanaka e Chandel, 2010; Valko et al., 2006; Valko et al., 2007). Em células de *S. cerevisiae*, por exemplo, as EROs atuam como um sistema de monitoramento interno de controle para manter o equilíbrio entre a quantidade de EROs produzida endogenamente por processos metabólicos e a atividade dos sistemas de defesas antioxidantes (Li et al., 2020). Contudo, a exposição das células a agentes estressores como produtos químicos, radiação ionizante, ou exposição a metais pesados presentes no meio externo, podem acionar uma produção excessiva destas espécies, tornando os mecanismos de defesa incapazes de reverter seus danos metabólicos (Kalyanaraman, 2013). Esse aumento das EROs danifica componentes celulares como lipídeos, proteínas e DNA (Fedoseeva et al., 2017). A peroxidação lipídica, por exemplo, diz respeito a um processo de degradação oxidativa dos lipídeos iniciado por um mecanismo de reação em cadeia de um radical livre, a qual promove a conversão de lipídios insaturados em hidroperóxidos lipídicos, aumentando a fluidez da camada fosfolipídica da membrana, tornando-a mais susceptível e levando à morte celular (Avery, 2011).

Uma resposta comum a presença de estresse oxidativo é a paralisação da síntese de enzimas essenciais ao metabolismo celular, como forma de poupar a energia celular devido o processo de síntese proteica demandar bastante energia (Picazo e Molin, 2021). Devido a isso, o controle da síntese de proteínas precisa ser altamente regulado sendo também controlado através da via de sinalização de nutrientes, como a via do alvo da rapamicina (TOR) e da via PKA (Plank, 2022). Dessa

forma, os níveis de EROs produzidos precisam ser estritamente controlados de forma a garantir o funcionamento adequado da mitocôndria e dos componentes celulares (Mariá et al., 2013).

3.5.1 Radical ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

As reações que geram ATP na mitocôndria requerem elétrons de substratos reduzidos para serem passados ao longo da cadeia de transporte de elétrons. Durante o metabolismo oxidativo, o oxigênio molecular (O_2), sofre a redução de quatro elétrons para formar H_2O . No entanto, um influxo contínuo de elétrons leva ao aumento de vários tipos de intermediários de radicais livres ou substâncias altamente reativas. O EROs mais conhecido e o principal subproduto da respiração produzido dessa maneira é o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado através da redução do primeiro elétron pelo O_2 , conhecida como redução mono-eletrônica (Temple et al., 2005; Cohen, 1989; Picazo e Molin, 2021). A atuação direta do radical $O_2^{\bullet-}$ como oxidante não é muito expressiva, pois, além de ser rapidamente eliminado pela ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD), apresenta baixa capacidade em reagir diretamente com aminoácidos, podendo oxidar com mais afinidade aglomerados de Fe-S presentes em proteínas transportadoras de elétrons (Li et al., 2016). Porém, apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, é um mediador importante em inúmeras reações oxidativas em cadeia, sendo também precursor para geração de outras EROs, tanto radicalares, como o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), como não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell, 2006).

3.5.2 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A molécula de H_2O_2 , por não apresentar elétrons desemparelhados, não é considerada um radical e, por isso, apresenta maior estabilidade (tempo de meia-vida de aproximadamente 1ms em sistemas celulares) e seletividade quanto às suas reações biológicas. Em pH fisiológico, a baixa concentração de próton desfavorece a espontaneidade da reação e o H_2O_2 é formado enzimaticamente pela ação da enzima superóxido dismutase (Sod) através de um processo de dismutação, a qual atua a partir do $O_2^{\bullet-}$ remanescente da respiração na tentativa de eliminá-lo (Birben et al., 2012; Halliwell, 2006). Apesar da estabilidade, o H_2O_2 pode ultrapassar livremente as

membranas celulares e, por isso, necessita ser rapidamente removido das células para evitar a reação com metais de transição como os íons de ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+) nas chamadas reações de Fenton levando a formação de radicais altamente reativos, como a espécie radicalar hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) (Halliwell e Gutteridge, 2007; D'autréaux e Toledano, 2007).

O H_2O_2 é a EROs mais abundante em organismos aeróbios, seja como produto secundário ou mesmo originado por ação de enzimas. Representa, ainda, a principal EROs envolvida na detecção, sinalização e regulação do sistema redox intracelular (Korovila et al., 2017). O maior impacto na célula pela presença do H_2O_2 ocorre através do grupamento tiol ($-\text{SH}$) em resíduos de cisteína presente nas peroxidases. O aumento da concentração do H_2O_2 , seja produzido pelas mitocôndrias, seja de fonte exógena, produz oxidação de resíduos de cisteína em proteínas específicas ao invés de oxidar de forma indiscriminada tiois de cisteínas livres, mostrando que a oxidação tem como alvo preferencial a síntese de proteínas. Normalmente, a porcentagem basal média da oxidação reversível de resíduos de cisteína no proteoma está entre 5 a 12%, podendo ser elevado para até 40% com adição de uma agente estressor externo, como o aumento da concentração de H_2O_2 (Go e Jones, 2013). Em vista disso, propomos a utilização do H_2O_2 como agente estressor exógeno para estudar os mecanismos de defesa antioxidante em *D. bruxellensis*.

3.5.3 Radical Hidroxila ($\text{OH}^\bullet$)

O radical $\text{OH}^\bullet$ é a espécie, derivada do oxigênio, mais reativa e que apresenta o menor tempo de meia vida dentre as EROs. A principal via de geração deste radical *in vivo* ocorre através da decomposição do H_2O_2 catalisada por metais de transição, principalmente o ferro (Reações de Fenton) (Fedoseeva et al., 2017; Atia et al., 2014). A reação de Fenton consiste em uma reação redox, na qual o Fe(II) é oxidado a Fe(III) por H_2O_2 , o qual é por sua vez reduzido ao íon hidroxila e ao radical hidroxila, como representado na reação abaixo (Equação 2).



Devido a sua alta reatividade biológica, o radical $\text{OH}^\bullet$ é capaz de reagir rapidamente com quase todas as biomoléculas: carboidratos, lipídios, aminoácidos, DNA e ácidos orgânicos. Além disso, não existe defesa antioxidante enzimática específica em sua eliminação, o que faz dele o radical livre mais danoso em termos celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007).

3.6 DEFESA ANTIOXIDANTE

A detecção e a neutralização de EROs se tornam importantes para a manutenção da viabilidade celular, levando a uma pressão seletiva para o desenvolvimento de sistemas de defesa antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim como outros organismos, as leveduras desenvolveram seu sistema de defesa de acordo com o nível e o tipo de agente estressor. Pequenas quantidades de EROs podem, apenas, levar a resistência de agentes antioxidantes, porém, concentrações bem elevadas destes agentes paralisam a divisão celular para indução de mecanismos de reparos, e quando estes são ineficazes, encaminham para a morte celular (Temple et al., 2005). Uma grande parte dos genes expressos estão envolvidos na manutenção da resposta a EROs. Em *S. cerevisiae*, 15% dos genes respondem a presença de oxidantes mostrando a existência de vias simples, paralelas e conectadas defesa a EROs.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que possuem a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação de substratos alvos de agentes oxidantes (Valko et al., 2006; Valko et al., 2007). As células de *S. cerevisiae*, por exemplo, apresentam sistemas de defesa antioxidante enzimática e não enzimática. Dentre os antioxidantes não enzimáticos naturais encontram-se a glutathiona (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides e outros. Um antioxidante sintético muito utilizado tanto na clínica médica como em experimentos de laboratório é a N- acetilcisteína (NAC), formada pela união de uma acetoamina com uma cisteína (Samuni et al., 2013). Os antioxidantes de origem enzimática são representados pela superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), Glutathiona-peroxidase (Gpx), Glutathiona redutase (GR), Glutathiona sintetase (GS), Glutarredoxinas, (GRX), Tiorredoxinas (Trx) (Vázquez et al., 2017; Valko et al., 2006; Valko et al., 2007).

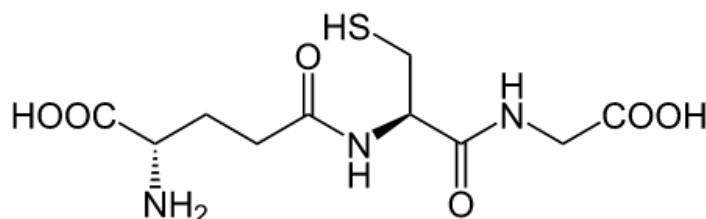
3.7 ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

3.7.1 Glutathione (GSH)

A Glutathione (GSH) consiste em um tripeptídeo (L- γ -glutamyl-L-cystinylglycine) de baixo peso molecular presente em elevadas concentrações na maioria dos organismos, a qual atua como um dos principais tampões redox capazes de combater as EROs de forma não enzimática (Kojer et al., 2012). Diversas funções são atribuídas para a GSH em muitos processos celulares como a importante atuação na eliminação de oxidantes, atuam também na manutenção do estado de oxido-redução das ligações dissulfeto, na proteção das cisteínas de sofrer superoxidação irreversível e na eliminação compostos eletrofílicos (Hwang et al., 1992; Grant et al., 1996; Ostergaard et al., 2004). Além disso, são capazes de participar do transporte de aminoácidos, síntese de ácidos nucleicos e proteínas e síntese de grupos ferro-enxofre na matriz mitocondrial (Toledano et al., 2013; Morano et al., 2012). O intervalo da concentração fisiológica da GSH em células de *S. cerevisiae* está entre 1-10 mM. Em concentrações muito reduzidas, em torno de 0,1 mM, as atividades celulares são prejudicadas enquanto a proteção nuclear ao dano oxidativo é mantida (Drakulic et al., 2005). Em situações de estresse oxidativo celular, os valores de GSH podem ultrapassar de 40 mM para proteção das funções citosólicas e nucleares (Hattem et al., 2014).

A função desenvolvida pela GSH está no grupamento sulfidrila (-SH) presente no resíduo de cisteína (Figura 5). A reação do grupo sulfidrila com agentes oxidantes produz um dissulfeto de glutathione, chamada glutathione oxidada (GSSG), a qual é regenerada em uma reação dependente de NADPH catalisada pela flavo-enzima glutathione redutase (Glr1) no intuito de manter elevada a taxa do GSH intracelular reduzido (Carmel-Harel et al., 2000; Meister e Anderson, 1983). Além de seu papel como eliminador de radicais livres nas células, a GSH funciona como cofator fornecendo elétrons para redução de ligações dissulfeto em proteínas antioxidantes, incluindo glutathione peroxidases (GPXs) e glutathione reductases (GRXs) (discutidas a seguir) (Outten e Culotta, 2004).

Figura 5 - Estrutura química da Glutathiona Reduzida (GSH).



Fonte: Hatem et al., 2014.

Sabe-se que a produção da GSH acontece unicamente no citosol para assim ser distribuída para outros componentes celulares como, por exemplo, as mitocôndrias (Mckeran et al., 1991; Toledano et al., 2013). Esta molécula é sintetizada em duas etapas dependentes de ATP, catalisada através da ação sequencial da enzima Q-glutamilcisteína sintetase (Gsh1) e glutathiona sintetase (Gsh2), respectivamente (Grant et al., 1996). Células mutantes para o gene *GSH1* (incapazes de produzir GSH) são incapazes de crescer em aerobiose, mas esse crescimento é reestabelecido após adição exógena de GSH. Isso mostra sua importância para o funcionamento celular (Grant et al., 1996; Stephen e Jamieson, 1996).

A GSH é o principal tampão redox em células eucarióticas, com isso, a razão molar GSSG/GSH (glutathiona oxidada/glutathiona reduzida) dentro da célula é considerada importante medida da situação redox (Drakulic et al., 2005). Contudo, atualmente, sabe-se que a investigação de processos redox é difícil devido ao grande número existente de pares redox celulares, os quais geralmente encontram-se desequilibrados entre si e transmitem informações biológicas diferentes, podendo variar bastante com o compartimento e tipo celular analisado. Neste sentido, são necessárias medidas quantitativas e específicas dos pares redox para compreender mais detalhadamente a biologia dos sistemas redox. Estudos utilizando biossensores com sondas fluorescentes verdes sensíveis às condições redox do meio mostraram que grande parte dos reservatórios de glutathiona dos compartimentos celulares (citosol, espaço intermembrana e matriz mitocondrial) encontravam-se no estado reduzido (Cummings et al., 2000; Braun et al., 2010; Remington et al., 2011; Kojer et al., 2012).

Em *S. cerevisiae*, a entrada da GSH ocorre por duas membranas: membrana externa e interna. Na membrana externa existem as porinas, proteínas transmembranares responsáveis pela difusão de pequenas substâncias, Por1 e Por2

(sendo Por1 a forma predominante); e as translocases da membrana externa (TOM), enzimas que catalisam o movimento de íons ou de moléculas através da membrana (Shoshan-barmatz et al., 2010). Segundo o estudo realizado por Kojer et al (2012), o reservatório de GSH presente no citosol e no espaço intermembrana mitocondrial (IMS) estão conectados cineticamente, sendo as porinas as responsáveis por assegurar o rápido equilíbrio entre os dois compartimentos. Cummings et al (2000) avaliou o comportamento de mitocôndrias isoladas de células sem porinas (Δ Por1) e mostrou que o potencial de óxido redução da glutathiona (E_{GSH}) no citosol e na matriz mitocondrial permaneceram inalterados, enquanto o IMS apresentou-se, claramente mais oxidado. Aliado a isto, nos estudos de Kojer et al (2012), foi possível perceber também que na ausência de Por1, a GSH do IMS não é mais equilibrada com o citosol por falta de conexão. Além disso, foi visto que o E_{GSH} da matriz não é afetado e, por isso modulada de forma independente do citosol e IMS. Sendo assim, neste cenário *in vitro*, as porinas não contribuem para o transporte de glutathiona para a matriz mitocondrial que pode ser devido a uma taxa que limita o transporte de glutathiona sobre a membrana interna.

3.7.2 N-acetilcisteína (NAC)

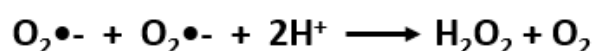
A molécula de N-acetilcisteína (NAC), também conhecida como N-acetil-L-cisteína, é um outro composto com propriedades redox, só que artificial. Essa molécula é formada pela união de uma acetoamida (N-acetil) que confere a propriedade hidrofílica à molécula e, portanto, sua maior solubilidade em meio aquoso, e uma cisteína que fornece o grupamento sulfidril que é responsável por sua atividade antioxidante, assim como a sulfidril da GSH (Samuni et al., 2013). Na célula, a NAC é convertida em cisteína por desacetilação e o aminoácido pode participar diretamente de reações de transferência de elétrons (Ozgur et al., 2015; Hennicke et al., 2013). A cisteína também é fornecida para sustentar a síntese de glutathiona GSH (Sjodin et al., 1989; Raftos et al., 2007). A NAC tem a capacidade de interagir diretamente com oxidantes, como H_2O_2 . Nesta reação, o grupamento tiol (-SH) de duas moléculas de NAC são oxidadas formando uma ligação dissulfeto (R = Resíduo) (Equação 3).



3.8 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

3.8.1 Superóxido dismutase (Sod)

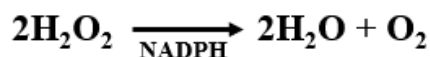
As enzimas Sod tem papel fundamental na defesa contra espécies reativas de oxigênio e estão presentes em todos os lugares de um sistema de defesa antioxidante (Meng et al., 2017). Catalisam reações de dismutação que unem 2 ânions radical superóxido para formar oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equação 4). Este último, pode posteriormente ser reduzido a água enzimas peroxidases e catalase, e quando não eliminado pode gerar radicais hidroxila (Fridovich, 1995).



As células de *S. cerevisiae* expressam duas isoformas de Sod: uma citosólica e também presente no espaço intermembrana mitocondrial, dependente dos metais de cobre (Cu-SOD) e Zinco (Zn-SOD), chamada de Sod1; e uma presente na matriz mitocondrial dependente de Manganês (Mn-SOD), chamada de Sod2 (CULOTTA et al, 2006). Estas desempenham papéis diferentes e importantes na desintoxicação de ânions superóxidos (Meng et al., 2017). A Sod2 desempenha um papel central na desintoxicação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido pela cadeia respiratória mitocondrial. Logo, o mutante ΔSOD2 perde completamente a capacidade de crescer sob condições respiratórias e não aparenta estar envolvido na defesa contra oxidantes adicionados externamente. A levedura mutante ΔSOD1 apresenta pouco crescimento em condições respiratórias e elevada sensibilidade a agentes oxidantes exógenos. (Longo et al., 1996; Meng et al., 2017).

3.8.2 Catalase

Existem várias enzimas que são responsáveis pela eliminação do H_2O_2 , quando existe aumento excessivo em sua concentração. Uma delas é a catalase, a qual é responsável por promover a dismutação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Equação 5) e utiliza as propriedades redox do seu grupo heme para entrar em contato com o seu substrato (Kehrer, 2000).



Em *S. cerevisiae* existem duas catalases: Cta1 presente nos peroxissomos e Ctt1 localizada no citosol, mas que atuam da mesma forma (Meng et al., 2017; Hiltunen et al, 2003). A expressão do gene *CTT1* é induzida sob a presença de estresse oxidativo e a expressão do gene *CTA1* é estimulada na presença de ácido graxo, quando este é a única fonte de carbono presente no meio (Izawa et al., 2007). Os mutantes isolados de um dos genes (*ctt1Δ* ou *cta1Δ*), em condições aeróbicas, não são sensíveis ao peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio, se comparado com o tipo selvagem. Contudo, a deleção dos dois genes (*Ctt1Δ* e *cta1Δ*), um duplo mutante, apresenta sensibilidade ao peróxido, indicando efeito sinérgico dos produtos das enzimas na levedura (Meng et al., 2017; Hiltunen et al., 2003).

3.8.3 Glutathione peroxidase (Gpx)

As enzimas glutathione peroxidases (Gpx) reduzem o H_2O_2 e outros hidroperóxidos orgânicos utilizando o potencial redutor da GSH (Figura 5) (Morano et al., 2012; Tian, 2021). As Gpx são consideradas as principais enzimas capazes de reparar as consequências do estresse oxidativo, sob efeito da peroxidação lipídica da membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007). Neste grupo, existem duas classes de enzimas Gpx: as clássicas tetraméricas, as quais apresentam características solúveis e agem sobre hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos; e as monoméricas, hidroperóxidos fosfolipídeos (PHGPXs), que se encontram normalmente associadas à membrana (Herrero et al., 2008).

Estudos iniciais, realizados por Inoue et al (1999), indicaram que a levedura *S. cerevisiae*, expressa três Gpx nomeadas de Gpx1, Gpx2 e Gpx3. Posteriormente, descobriu-se que essas três isoformas fazem parte do grupo dos PHGPXs (Hidroperóxidos fosfolipídios) e apresentam capacidade catalítica para reduzir tanto os hidroperóxidos fosfolipídios solúveis como os lipídicos, além de atuarem na resistência sobre metais pesados; sendo assim, são capazes de atuar na proteção e reparação no processo de oxidação lipídica da membrana oriunda de estresse oxidativo (Avery e Avery., 2011; Avery, 2004; Roveri, Maiorino e Ursini, 1994). A Gpx3 é mais atuante contra a presença de peróxidos e a toxicidade de metais, se

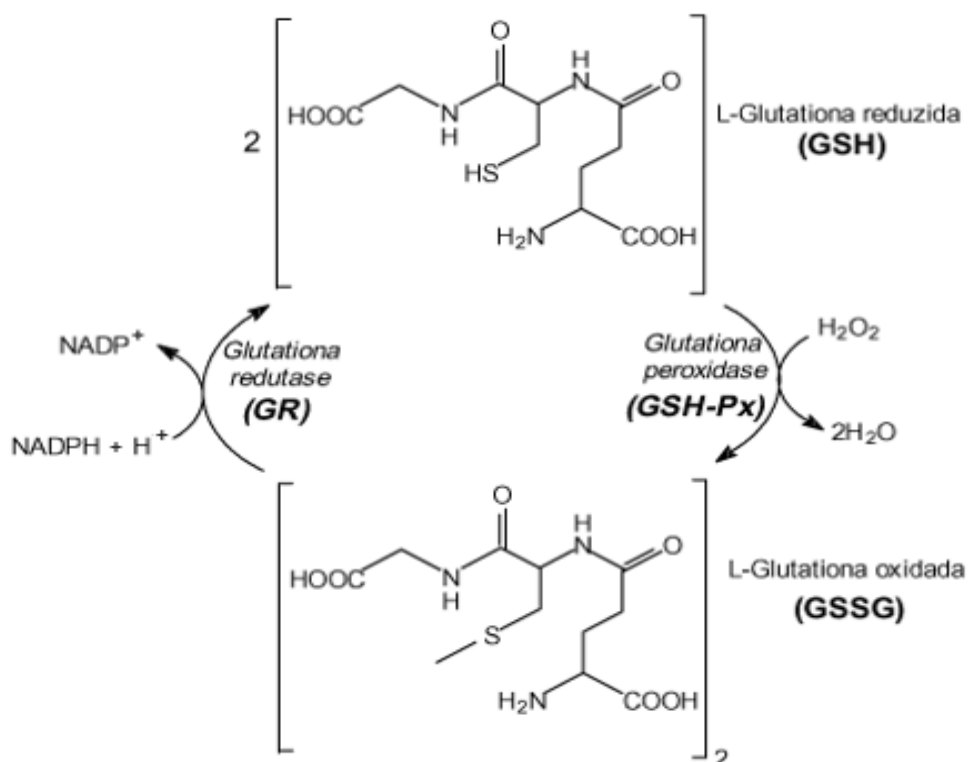
comparado com a Gpx1 e Gpx2. Na presença de H_2O_2 , sob estresse oxidativo, a Gpx3 é bastante importante, pois estudos *in vitro* mostraram a sua atuação como principal transdutor de sinal na presença do peróxido de hidrogênio, através do fator de transcrição Yap1, que é o principal regulador dos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (Azevedo et al, 2003; Toledano et al, 2013). Para regulação desta complexa resposta, em *S. cerevisiae* a detecção do estresse oxidativo promove o acúmulo nuclear de fatores de transcrição específicos na resposta ao estresse, sendo Yap1p o principal deles (Lee et al., 1999), que vai regular a expressão desses genes. Existem outros fatores que são ativados em repostas variadas ao estresse, como o Msn2 e Msn4 (Boisnard et al., 2009).

3.8.4 Glutathione Redutase (Gr)

Esta enzima atua juntamente com a Gpx, porém age de forma indireta para a remoção de EROs. A principal função da Gr é impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione, promovendo a restauração da forma reduzida (GSH) (Meister e Anderson, 1983; Kojer et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, o gene *GLR1* codifica a enzima glutathione redutase citosólica e mitocondrial, representada por duas isoformas, a Glr1 citosólica que é o principal determinante do estado redox da glutathione do espaço intermembranar mitocondrial, e a Glr1 mitocondrial que tem papel na resistência à hiperóxia. Ambas são responsáveis por manter a GSH em seu estado reduzido (Outten e Culotta, 2004; Kojer et al., 2012).

A atividade da enzima Gr é dependente da presença de NADPH como doador de elétrons para a redução da GSSG de volta à sua forma reduzida GSH (Fig. 6). Portanto, é de suma importância para as células a presença de cofatores que as permitam lidar com o processo oxidativo (Li et al., 2020; Kojer et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, o NADPH citosólico é produzido principalmente pela via da pentose fosfato, através da enzima Zwf1, enquanto na matriz mitocondrial boa parte é resultante da atividade da NADH quinase (Miyagi et al., 2009) ou ainda pela β -isocitrato desidrogenase dependente de $NADP^+$ (Jo et al., 2001).

Figura 6 - Interconversão da Glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas Glutathiona peroxidase (GSH-Px) e Glutathiona redutase (GR).

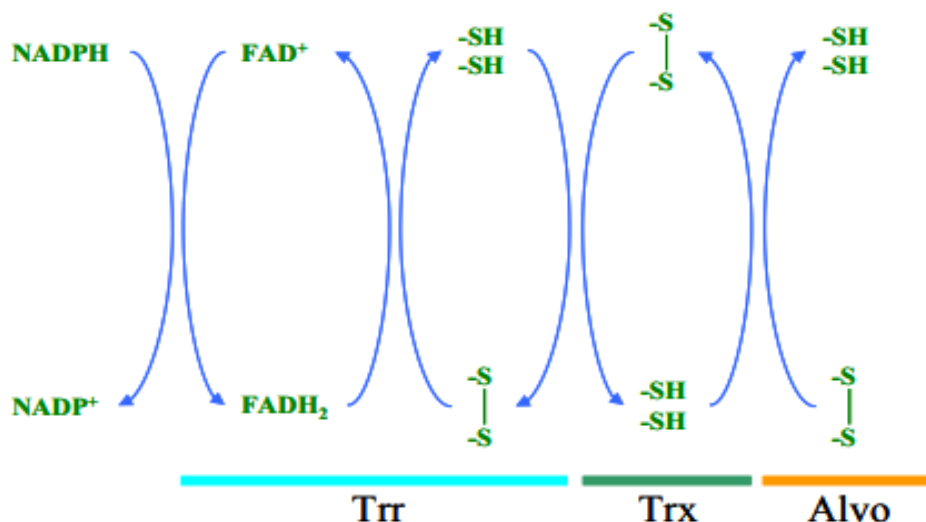


Fonte: Figura adaptada de Maister e Anderson (1983).

3.8.5 Tiorredoxinas (Trx)

As tiorredoxinas (Trx) são oxidorredutases que contêm dois resíduos de cisteína, altamente conservados em seus sítios ativos enzimáticos, de baixo peso molecular, capazes de reduzir ligações dissulfetos em proteínas como enzimas e fatores de transcrição. As Trx não apresentam sítios de ligação com a molécula de GSH, diferentemente das Glutarredoxinas (Grx) (discutidas posteriormente). Ou seja, as Trx reduzem ligações dissulfeto de proteínas oxidadas, utilizando os elétrons provenientes dos seus resíduos de cisteína, tornando-se oxidada. A redução da Trx acontece por meio de uma Tiorredoxina redutase (Trr) que utiliza a seu favor os elétrons do NADPH. Sendo assim, a tiorredoxina (Trx), Tiorredoxina redutase (Trr) e o cofator NADPH compõem o sistema Tiorredoxina (Figura 7) (Toledano et al., 2007).

Figura 7 - Redução da Trx por NADPH mediada pela catálise da tiorredoxina redutase (Trr). As ligações dissulfeto na proteína oxidada são reduzidos pelos elétrons da Trx. A Trx oxidada será reduzida pela Trr através dos elétrons provenientes do NADPH. A Trr apresenta dois centros redox, um grupo FAD e um grupo ditiol, envolvido na redução de tiorredoxina.



Fonte: Figura adaptada de Nakamatsu, 2012.

3.8.6 Glutarredoxinas (Grx)

As glutarredoxinas (Grx) atuam reduzindo as ligações dissulfeto utilizando elétrons contidos em resíduos de cisteínas altamente conservados no seu sítio ativo em proteínas ou mistos de proteínas (Glutathione e proteínas) (Herrero et al., 2008). A partir daí a Grx oxidada é reduzida pela GSH, a qual foi restaurada pela NADPH em uma reação catalisada pela Glutathione redutase (Gr).

3.8.7 Peroxirredoxina (Prx)

Um dos principais substratos da Trx são as Peroxirredoxinas (Prx), uma família de enzimas antioxidantes que não utilizam um cofator como as demais enzimas antioxidantes, e sim o aminoácido cisteína para decompor uma ampla variedade de peróxidos, como o H₂O₂. Esta é a principal via de controle e remoção dos peróxidos na célula. Em *S. cerevisiae* existem cinco Prx, sendo três citoplasmáticos (Tsa1, Tsa2 e Ahp1), uma nuclear (Dot5) e um que funciona nas mitocôndrias (Prx1) (Rhee et al., 2005; Troussicot E Molin, 2021). Todas estas enzimas são efetivamente reguladas para atuarem como antioxidantes e resistir a presença de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (Wong et al., 2004; Jang et al., 2004; Cha et al., 2003; Park et al., 2000).

Além disso, essas cinco Prxs parecem atuar de forma coordenada e interligada para desintoxicação por H_2O_2 . A deleção de uma ou mais isoformas de peroxirredoxinas em *S. cerevisiae* não produz efeito em cultivo em meio contendo fonte de carbono fermentável, com a glicose. No entanto, o crescimento é inibido na presença de concentrações elevadas de oxidantes, como H_2O_2 (Demasi et al., 2006, Wong et al., 2004).

3.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E MOTIVAÇÃO

Os trabalhos com a levedura *D. bruxellensis* foram iniciados pelo nosso grupo de pesquisa no ano de 2005, com a identificação desta levedura como importante constituinte da população de leveduras do processo industrial de fermentação de etanol combustível na região Nordeste do Brasil (De Souza Liberal et al., 2007; Basílio et al 2008). A partir disto, muitos estudos genéticos e fisiológicos foram iniciados acerca desta levedura e foram capazes de comprovar, definitivamente, que *D. bruxellensis* é capaz de produzir etanol com o mesmo rendimento que *S. cerevisiae* na ausência de oxigênio, o que é bastante incrementado pela presença de nitrato no substrato (Peña-Moreno et al., 2019). O problema relacionado com esta questão metabólica é que a levedura *Dekkera bruxellensis* GDB 248 foi relatada como mais sensível aos danos oxidativos causados pelo H_2O_2 do que *Saccharomyces cerevisiae* (Leite et al., 2016), apesar da alta eficiência respiratória apontada pela presença de três sítios de fosforilação em sua cadeia respiratória (Leite et al., 2013). Além disso, a levedura *D. bruxellensis* é capaz de assimilar nitrato, uma característica não compartilhada com *S. cerevisiae* (de Barros Pita et al., 2011). Porém a assimilação desta fonte de nitrogênio produz estresse oxidativo em aerobiose como fruto do próprio metabolismo respiratório (Peña-Moreno et al., 2021). Diante disto, neste trabalho complementamos essas análises prévias com estudos do metabolismo respiratório e gerador de estresse oxidativo em relação à própria capacidade respiratória, produção de agentes protetivos intracelulares e dos danos que este metabolismo respiratório pode causar à estrutura e funcionamento mitocondrial. Sendo assim, o presente estudo pretende apresentar pela primeira vez aspectos fundamentais da resposta celular a estresse oxidativo como ponto fundamental do metabolismo de *D. bruxellensis* GDB 248 que impacta significativamente a produção de etanol nos processos industriais.

4 ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE *DEKKERA BRUXELLENSIS* EM ESTRESSE OXIDATIVO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

Mariana Rodrigues Xavier¹, Gilberto Henrique Telles¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Will de Barros Pita³, Marcos Antonio de Moraes Jr.¹

¹Departamento de Genética, Centro de Biociências, UFPE

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, UFPE

³Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, UFPE

Autor correspondente:

Marcos Antonio de Moraes Jr

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife PE, 50.670-901, Brasil.

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: marcos.moraisjr@ufpe.br

ORCID: 0000-0002-9727-0300

Resumo

A levedura *D. bruxellensis* é bem conhecida por sua adaptação ao processo industrial de fermentação para produção de etanol combustível. Por isso, vem sendo bastante estudada para se compreender os mecanismos celulares e moleculares de sua adaptação àquele ambiente, principalmente o relacionado com a tolerância a estresse. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de defesa de *D. bruxellensis* contra estresse oxidativo usando peróxido de hidrogênio como modelo. *D. bruxellensis* mostrou ser mais sensível a estresse oxidativo do que *S. cerevisiae* pelos resultados realizados para concentração inibitória mínima e concentração mínima biocida. Isso é justificado pela ausência na produção de proteínas sulfidriladas nas células cultivadas em glicose e amônio, que é não revertida pela adição de glutatona no meio de cultivo. Essas proteínas são produzidas quando a fonte de carbono é exclusivamente respirável, tornando as células resistentes. Os dados são corroborados pela indução dos genes *GPX* e *SOD*. Em nitrato, esse mecanismo de defesa é inibido, tornando as células novamente sensíveis. A ausência

de indução de tolerância pela restrição calórica e pelo pré-tratamento com doses subletais indicou que não há sistema de indução de tolerância nessa levedura. Por fim, experimentos com o uso de inibidores das quinases das vias PKA e TOR, reguladoras do crescimento celular, revelaram que esse mecanismo de defesa antioxidante depende principalmente do mecanismo regulatório da via TOR e permitiram a proposição de um modelo regulatório, ainda que preliminar, sobre o controle do mecanismo de defesa antioxidante em *D. bruxellensis* dependente do sistema Sod-Gpx-tiorredoxina.

Palavras-chave: estresse oxidativo; fermentação; nitrato; peróxido de hidrogênio; proteína quinase; tiorredoxina.

4.1 INTRODUÇÃO

Dekkera bruxellensis é uma levedura muito encontrada no ambiente industrial, principalmente em processos fermentativos de produção de vinhos e cervejas (de Souza Liberal et al., 2007; Roder et al., 2007; Oelofse et al., 2008). Vários trabalhos mostram que esta levedura é reconhecida nos processos industriais de produção de bioetanol com capacidade fermentativa para produzir etanol em rendimentos semelhantes àqueles alcançados por *S. cerevisiae* (Blomqvist et al. 2010; Rozpedowska et al., 2011; Peña-Moreno et al 2019). O grande problema observado é a reduzida produtividade volumétrica justificada pela lenta assimilação dos açúcares e desvio de nutrientes para produção de acetato (Basílio et al., 2008; Leite et al., 2012; de Barros Pita et al 2011; Pereira et al., 2012).

Dentre as características importantes, a capacidade de tolerar diferentes formas de estresse ambiental, tais como estresse térmico (Galafassi et al 2013), etanólico (Bassi et al., 2013), ácido (Galafassi et al 2013), estresse oxidativo (Leite et al., 2013), além de escassez nutricional, torna bastante relevante termos mais conhecimento da fisiologia e metabolismo dessa levedura para seu emprego em diferentes processos industriais. O estresse oxidativo se destaca pela interferência na disponibilidade da capacidade redutora representada por moléculas do tipo glutational, NAD(P)H e tiorredoxinas (Carney et al., 1991; Avery et al., 2011). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas radicalares instáveis, com propriedades distintas e extremamente reativas, formadas a partir da ativação ou derivadas dos produtos da redução incompleta do oxigênio molecular (O_2). Em condições fisiológicas, as EROs

são produzidas em uma ampla variedade de processos biológicos e geradas nos organismos aeróbios pelo metabolismo respiratório nas mitocôndrias, gerando o radical aniônico superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Adam-vizi e Chinopoulos, 2006; Holmström e Finkel, 2014). O estresse oxidativo também é produzido pela presença de agentes oxidantes no meio. As moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem atravessar livremente as membranas celulares e atuar como subproduto intermediário da formação da reação com íons de ferro e cobre, através de reações de Fenton, para gerar a espécie radicalar hidroxil ($OH^{\cdot}$), sendo esta uma molécula altamente nociva em sistemas vivos devido sua elevada reatividade (Baumber et al., 2000, D'autréaux e Toledano, 2007; Fedoseeva et al., 2017).

Em *S. cerevisiae*, esse tipo de estresse oxidativo é produzido em grandes quantidades quando as células são cultivadas em meio contendo fontes de carbono estritamente respiráveis, enquanto são menos produzidas em glicose devido a indução do metabolismo respiro-fermentativo pela característica *Crabtree* positiva dessa levedura (Piskur et al., 2006). As defesas celulares contra essas formas de estresse e o mecanismo de resposta a estresse oxidativo são importantes para a produção em aerobiose de biomassa celular como um produto industrial, seja como levedura para alimentos seja para bebidas. Além disso, também são importantes para processos anaeróbicos de produção de etanol combustível que contenham moléculas oxidantes, como melaço ou hidrolisado de biomassa lignocelulósica. A levedura *D. bruxellensis*, assim como *S. cerevisiae*, também apresenta o metabolismo respiro-fermentativo em glicose, o que caracteriza o efeito *Crabtree* (Piskur et al., 2006; Woolfit et al., 2007; Leite et al. 2013). Já a galactose parece ser metabolizada exclusivamente pelo metabolismo respiratório oxidativo (Moktaduzzaman et al., 2015). Portanto, faz-se necessário compreender a diferença no metabolismo celular entre esses dois açúcares.

A maior capacidade respiratória de *D. bruxellensis* em relação a *S. cerevisiae*, apontada pela presença de três sítios de fosforilação em sua cadeia respiratória (Leite et al., 2013), indica que esta levedura poderia ser mais tolerante ao estresse oxidativo. Mas, os resultados de sensibilidade ao H_2O_2 indicam que isto não é assim. Além disso, a capacidade metabólica de *D. bruxellensis* de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio produz estresse oxidativo em anaerobiose como fruto do próprio metabolismo respiratório (Peña-Moreno et al., 2020). Como esse diferencial metabólico parece ser industrialmente atrativo, então é necessário se estudar o

comportamento celular em resposta ao estresse oxidativo na presença e ausência de nitrato. Com isso, o presente estudo teve como objetivo estudar a resposta das células de *D. bruxellensis* ao efeito biocida do H₂O₂ quando cultivadas em aerobiose em meio contendo glicose ou galactose (metabolizada exclusivamente via respiração) como fonte de carbono e com amônio ou nitrato (indutora de estresse oxidativo) como fonte de nitrogênio. Os resultados revelaram aspectos importantes da resistência celular ao H₂O₂ dependente do estado metabólico das células, ou pelo tipo de fonte de carbono, ou pela fonte de nitrogênio, e apontam ainda diferenças significativas entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* no que diz respeito à regulação dessa resposta por meio dos dois principais mecanismos regulatórios mediados pelas quinases PKA e TOR.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Linhagens, condições de cultivo e reagentes

A linhagem *D. bruxellensis* GDB 248 (de Souza Liberal et al., 2007), depositada na coleção de culturas URM-Recife sob o número URM 8346, foi utilizada neste trabalho. A linhagem *S. cerevisiae* JP1 (Leite et al., 2013) foi empregada como referência. A manutenção das células foi realizada através de repiques constantes em placas de Petri com meio YPD-ágar (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica e 2% de ágar), mantendo as colônias de células frescas (Leite et al., 2013). Para os pré-inóculos, as células foram inoculadas em frascos de 50 mL contendo meio sintético YNB (*Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*) a 1,7 g/L suplementado com glicose, galactose, citrato ou glicerol como fonte de carbono (C) a 20 g/L e com sulfato de amônia (5 g/L) ou nitrato de sódio (6,43 g/L) como fontes de nitrogênio (N). Com isso, concentrações equimolares de C (666 mM) e N (75 mM) foram mantidas entre as diferentes composições dos meios. Os cultivos foram realizados a 30°C sob agitação constante de 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker por até 24h.

Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm por 3 min, lavadas com solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v) e suspensas em meio sintético das respectivas condições de cultivo para densidade óptica inicial de 0,1 DO_{600nm} (unidades de absorbância a 600 nm). Essas suspensões foram chamadas de inoculantes.

O peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, catálogo no. 7722-84-1) foi dissolvido em água deionizada para a concentração de 9,8 mM. A Glutathione reduzida (Sigma-Aldrich, catálogo no. PHR1359) foi dissolvida em água deionizada para a concentração de 100 mM. O peptídeo miristoilado 14-22 na forma de sal de trifluoroacetato (Sigma-Aldrich, catálogo no. P9115) foi usado como inibidor da proteína quinase A. Esse inibidor foi dissolvido em água deionizada para 75,6 μ M. O antibiótico rapamicina (Sigma-Aldrich catálogo no. R8171) foi usado como inibidor do complexo quinase TOR. Esse inibidor foi dissolvido em água deionizada para 200 ng/mL.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao peróxido de hidrogênio

Para determinação da CIM, 150 μ L da suspensão das células inoculantes cultivadas em Glicose (20g/L) e sulfato de amônio (5 g/L) foram transferidos para poços de placa de microtitulação e tratadas com H₂O₂ até a concentração máxima de 4 mM. As células foram cultivadas a 30°C sob máxima agitação em equipamento multileitor Synergy HT (Biotek, Suíça) e os valores de densidade inicial (zero hora) e densidade final (48 h) foram utilizados para cálculo da diferença de formação de biomassa ($\Delta DO = DO_{\text{final}} - DO_{\text{inicial}}$). O valor de incremento de biomassa em cada concentração de H₂O₂ foi relativizado pelo valor de incremento na condição controle sem tratamento (100%). O Valor de CIM foi definido neste trabalho como a concentração mínima que impediu o crescimento celular (Cansian et al., 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e triplicata técnica.

4.2.3 Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na tolerância ao H₂O₂

Para definição da Concentração Mínima Biocida (CMB), as suspensões celulares inoculantes cultivadas em meios contendo glicose ou galactose como fonte de C a 20 g/L na presença de sulfato de amônia (5 g/L) ou nitrato de sódio (6,43 g/L) como fontes de N, foram tratadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 60 minutos a 30°C sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker orbital. Em seguida, 5 μ L de cada condição foram transferidas para placa de meio

YPD-ágar e as placas incubadas por aproximadamente 48h a 30 °C. Este mesmo experimento foi realizado também para as fontes de C exclusivamente respiráveis citrato ou glicerol a 20g/L na presença de sulfato de amônia (5 g/L) ou nitrato de sódio (6,43 g/L) como fontes de N. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e triplicata técnica.

4.2.4 Testes de adaptação ao estresse oxidativo

O fenômeno de adaptação das células de *S. cerevisiae* ao H₂O₂ é observado quando as células são expostas a uma dose subletal durante 15 a 90 min (Branco, 2004). Para essa análise, células inoculantes foram preparadas nos diferentes meios contendo 0,15 mM de H₂O₂ a 30 °C sob agitação constante à 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker até a metade da fase exponencial de crescimento. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina estéril e ressuspensas novamente em salina estéril para 0,1 DO_{600nm}. A suspensão celular em cada meio foi dividida em diferentes microtubos que receberam concentrações crescentes de H₂O₂, entre 0,5 e 3 mM, e incubados por 60 min a 30 °C e agitação de 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker. O volume de 5 µL de cada condição foi gotejado em placas YPD-ágar e estas incubadas a 30 °C por aproximadamente 48h.

4.2.5 Ensaio de restrição calórica

A restrição calórica pelo cultivo de células de *S. cerevisiae* em meios com baixa concentração de glicose induz a resistência celular a diferentes formas de estresse (Lin et al., 2000). Para se testar esse fenômeno em *D. bruxellensis*, as células inoculantes cultivadas em meio com glicose (20 g/L) e amônio foram utilizadas para inocular meio sintético contendo YNB e amônio ou nitrato nas concentrações descritas acima e glicose nas concentrações de 2 g/L, 0,5 g/L e 0,2 g/L. As células foram cultivadas a 30 °C e agitação de 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker para a fase exponencial, coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina e testadas.

4.2.6 Ensaio de proteção celular por glutatona

Glutathiona Reduzida (GSH) foi utilizada como molécula antioxidante capaz de reverter o efeito oxidante causado pela presença do H_2O_2 em *S. cerevisiae* (Hattem et al, 2014). As culturas inoculantes cultivadas nos diferentes meios foram incubadas por 60 minutos na presença de GSH nas dosagens indicadas e depois tratadas por mais 60 minutos com peróxido de hidrogênio na dosagem subletal como indicado. Em seguida, 5 μ L de cada cultura foram gotejados em placa com meio YPD e as placas incubadas em estufa a 30°C por 48 h.

4.2.7 Ensaio de inibição das vias PKA e TOR

As culturas inoculantes cultivadas em glicose como fonte de C a 20g/L em sulfato de amônia (5 g/L) ou nitrato de sódio (6,43 g/L) como fontes de nitrogênio foram adicionadas em poços de placa de microtitulação (150 μ L) e suplementado na concentração de 20 μ M do inibidor da proteína quinase A, um peptídeo miristoilado, ou o inibidor da via TOR, a molécula de rapamicina, na concentração de 40ng/mL. As células foram cultivadas a 30°C sob máxima agitação em equipamento multileitor Synergy HT (Biotek, Suíça), com leitura automática de densidade óptica (DO_{600nm}) a cada hora. Para cada inibidor, foram escolhidas as concentrações que permitiam crescimento celular relativo a 50% da condição de referência sem os inibidores ($CIM_{50\%}$). Em seguida, cultivos foram realizados com a utilização de um inibidor na presença de peróxido de hidrogênio, ambos na concentração $CIM_{50\%}$, e incubados em equipamento multileitor Synergy HT (Biotek, Suíça), com leitura automática de densidade óptica (DO_{600nm}) sob máxima agitação.

4.2.8 Determinação do conteúdo de tióis nas células das leveduras

Avaliação da capacidade redutora das células das leveduras foi feita pela determinação da quantidade de radicais sulfidríla reduzidos no extrato celular usando o método baseado na reação com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) ou DTNB (Elsztein et al., 2011). Nesse método, mede-se a reação química entre os grupamentos SH e o DTNB que irá produzir o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela. As culturas inoculantes foram utilizadas para inocular os diferentes meios e as células foram cultivadas por aproximadamente 20h a 30°C sob

agitação de 160 rpm. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas em solução salina e concentradas em solução de EDTA 20 mM (pH 4,7) para 20 DO600nm. O volume de 400 µl de cada suspensão foi transferido para microtubo contendo 0,5 mg de pérolas de vidro (Sigma-Aldrich catálogo no. G8772). As células foram lisadas por seis ciclos de agitação no vórtex em velocidade máxima por 30 segundos, intercalados por 30 segundos em banho de gelo. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi coletado e dividido em dois grupos. Para avaliação da quantidade total de grupos tióis (TT) nas células, alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram misturadas com 390 µl do tampão Tris-HCL 0,2M (pH 8,2) e 10 mL da solução de DTNB. Os tubos foram encubados por 30 minutos ao abrigo da luz e em seguida as suspensões foram avaliadas em espectrofotômetro a 412 nm (DO). Em paralelo, 225 µl dos lisados foram misturados com 11,25 µl de ácido tricloroacético à 10% e encubado em gelo por 30 min. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min para separar o conteúdo de tióis dissolvido nos extratos das proteínas que formaram o sedimento. O volume de 400 µl do sobrenadante foi misturado com 450 µl de Tris-HCL 0,4 M (pH 8,9) e 13 µl de DTNB, incubados por 5 min a temperatura ambiente e avaliado em espectrofotômetro a 412 nm (DO) para determinação da concentração de tióis não-proteicos (TNP). Os valores de absorbância a 420 nm foram usados para se determinar a concentração das formas tiólicas a partir do valor de conversão calculado a partir da curva de calibração usando glutathiona reduzida (GSH). Em seguida, a concentração específica foi calculada dividindo-se a concentração de tióis nos sobrenadantes pela quantidade de célula usada para a lise. Para esse último valor, foi utilizado o fator de calibração calculado na relação entre a densidade óptica da cultura e a quantidade de biomassa (mgCel) (Leite et al., 2016). Os valores de grupos tióis presentes nas proteínas (TP) foram calculados pela diferença entre TT e TNP (Elsztein et al, 2011). Todas as determinações foram realizadas em triplicata técnica e duplicata biológica.

4.2.9 Quantificação da Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

O método fluorimétrico utilizado para quantificação de ROS é baseado na oxidação do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA) para a geração do produto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (Ohkawa et al., 1979). As células inoculantes

cultivadas em meio com glicose e amônio foram coletadas, lavadas com solução salina, ressuspensas em diferentes composições de meios para a concentração de 2 DO_{inicial} e distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços para incubação por 180 min a 30°C sob agitação constante de 160 rpm. O volume de 100 µL das culturas foram distribuídas em placa de microtitulação de 96 poços. Em cada poço foram adicionados de 100 µL da solução de DCF-DA 5 µmol/L, preparado em água deionizada, e incubados durante 45 min à temperatura de 37°C. A fluorescência foi mensurada a 504 nm (excitação) e 529 nm (emissão) em equipamento Varioskan™ Flash (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Onde indicado, GSH foi adicionada para a concentração de 1 mM durante a incubação celular nos diferentes meios. Todas as condições foram realizadas em triplicata técnica e duplicata biológica e os valores foram expressos em unidades de fluorescência por grama de célula.

4.2.10 Análise de expressão gênica por PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

As células inoculantes cultivadas em meio com glicose e amônio foram utilizadas para inocular os diferentes meios de cultura para 0,1 DO_{600nm} e incubadas até atingirem 0,5 DO_{600nm}. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas no mesmo meio para 5 DO_{600nm} e submetidas a tratamento com 1 mM de H₂O₂ por 1h a 30 °C sob agitação de 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina, coletadas por centrifugação e resuspensas 200 µL de solução de litase. A suspensão celular foi incubada por, aproximadamente, 1h a 30 °C e o RNA foi extraído usando o Maxwell® 16 LEV simplyRNA Blood Kit em equipamento Maxwell 16 (Promega Co., USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a concentração foi determinada por equipamento Nanodrop (ThermoFisher, USA). A síntese de cDNA foi realizada com uso do kit GoScript™ Reverse Transcription Mix e Oligo(dT) (Promega, USA) com 2,5 µg do RNA total para cada 20 µl da reação. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) no sistema de detecção ABI Prism 7300 (Applied Biosystems).

Quatro genes de *D. bruxellensis* GDB 248 foram analisados: GPX, SOD, GSH e YAP. As sequências de nucleotídeos desses genes foram obtidas da plataforma

Mycocosm Joint Genome Institute usando o banco de dados *Dekkera bruxellensis* CBS 2499 v2.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Dekbr2/Dekbr2.home.html>). O desenho dos primers, os genes de referência interna, a análise dos parâmetros de qualidade e a eficiência de amplificação e a especificidade da reação seguiram as instruções descritas por De Barros Pita et al. (2012) para análise de expressão por qPCR em *D. bruxellensis*. A sequência de nucleotídeos dos primers está descrita na Tabela 1. Controles de amplificação inespecífica e da contaminação por DNA genômico foram sempre executados em paralelo para controle interno (de Barros Pita et al., 2012). As curvas de amplificação foram analisadas pelo software SDS v.2.0 (Applied Biosystems) e as quantificações relativas foram realizadas no Microsoft® Excel® 2010. Para a quantificação da expressão gênica, o fator de normalização foi obtido dos genes de referência usando o applet geNorm, de acordo com a Guia do Usuário (Vandesompele et al., 2002). Aqui, usamos os termos sub-expressão para os genes regulados negativamente e sobre-expressão para os genes regulados positivamente para designar a abundância de transcritos de um determinado gene em um meio SD específico em relação ao SD de referência.

Tabela 1. Lista de primers desenhados a partir das sequências dos genes envolvidos na proteção celular contra estresse oxidativo em *D. bruxellensis* GDB 248.

Gene	Sequência (5'- 3')
<i>GPX</i>	ACACCTTCACACCAACTGACA GAGGACAACCTTGCCCTTGA
<i>GSH</i>	ATGTTTCCTATGCCTGCCCT ATCGCCAGCCCTTATCATCC
<i>SOD</i>	GTCCCGAATGCCCCTACATC TCGCCTAACAAGCCATGTGT
<i>YAP1</i>	CGTGCTGCGAACAATCTCC GGCAAAAGTCGTTGGGTGTG

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *DEKKERA BRUXELLENSIS* GDB 248 É MENOS TOLERANTE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DO QUE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* JP1

O H_2O_2 é uma espécie de forma oxigenada não-radicalar que consegue atravessar facilmente as membranas celulares e gerar estresse oxidativo em moléculas biológicas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) (Bleier et al., 2015; Eleutherio et al., 2018), constituindo um dos subprodutos da respiração aeróbia. Leite et al. (2016) reportaram que a linhagem *D. bruxellensis* GDB 248 (GDB 248) é mais sensível aos efeitos tóxicos dessa molécula do que a linhagem *S. cerevisiae* JP1 (JP1). Isso não era esperado, já que GDB 248 tem maior capacidade respiratória do que *S. cerevisiae* (Leite et al., 2013), o que indicava que deveria ser mais tolerante aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs). Para confirmar aquele resultado, as duas leveduras foram cultivadas em meio mineral definido contendo glicose como fonte de carbono e amônio como fonte de nitrogênio. O experimento para definição da concentração inibitória mínima (CIM) mostrou uma relação dose-resposta muito evidente, com inibição gradativa do crescimento da GDB 248 (Fig. 1A). O valor de CIM foi definido como 1,5 mM de H_2O_2 , enquanto o valor de 1 mM foi definido como a dose que reduziu o crescimento celular em 50% da condição referência. O estudo prévio realizado por Leite et al. (2016) reportou a perda de 80% da viabilidade celular de GDB 248 na concentração de 1 mM do H_2O_2 . O efeito citotóxico foi confirmado em teste de viabilidade em placa (Fig. 1B), definindo 1,5 mM a concentração biocida mínima (CBM) deste agente para GDB 248. Portanto, a ausência de crescimento celular foi devido a um intenso efeito citotóxico e não apenas a um efeito citostático. A partir desses resultados, foram definidos os valores de 1,5 mM e 1 mM como as doses letal e subletal, respectivamente, de H_2O_2 para GDB 248 neste trabalho. Por outro lado, a linhagem JP1 apresentou maior tolerância a este agente, com queda de 14% na biomassa celular apenas na concentração de 3 mM de H_2O_2 , em relação a condição referência. Isso corrobora a conclusão anterior de que GDB 248 é mais sensível ao estresse oxidativo provocado pelo H_2O_2 do que JP1 (Leite et al., 2016). Não foi observada diferença no perfil de viabilidade ao H_2O_2 entre as células de GDB 248 na fase exponencial (Fig. 1) ou estacionária do crescimento celular (dados não mostrados). Isso é um fato relevante, já que as células de *S.*

cerevisiae em fase estacionária são sempre mais resistentes a estresse do que as células em fase exponencial devido a desrepressão do mecanismo de resposta a estresse e indução da resposta adaptativa (Bayliak et al., 2017).

Seria essa sensibilidade provocada pela insuficiência dos mecanismos não enzimáticos de defesa antioxidante em *D. bruxellensis*? Para responder a essa pergunta, a quantidade de tióis totais que indica a presença de moléculas com grupamentos sulfidríla foi determinada no extrato celular das duas leveduras durante o crescimento exponencial. Os resultados mostraram que GDB 248 apresenta 51,3 mmol de grupos SH por grama de células, quase o dobro de JP1 com 28,1 mmol/gCel (Fig. 1C). Isso sugere que a sensibilidade de *D. bruxellensis* não é devida a insuficiência de radicais sulfidríla e que esse radical não parece ser fundamental na proteção celular contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 em GDB 248.

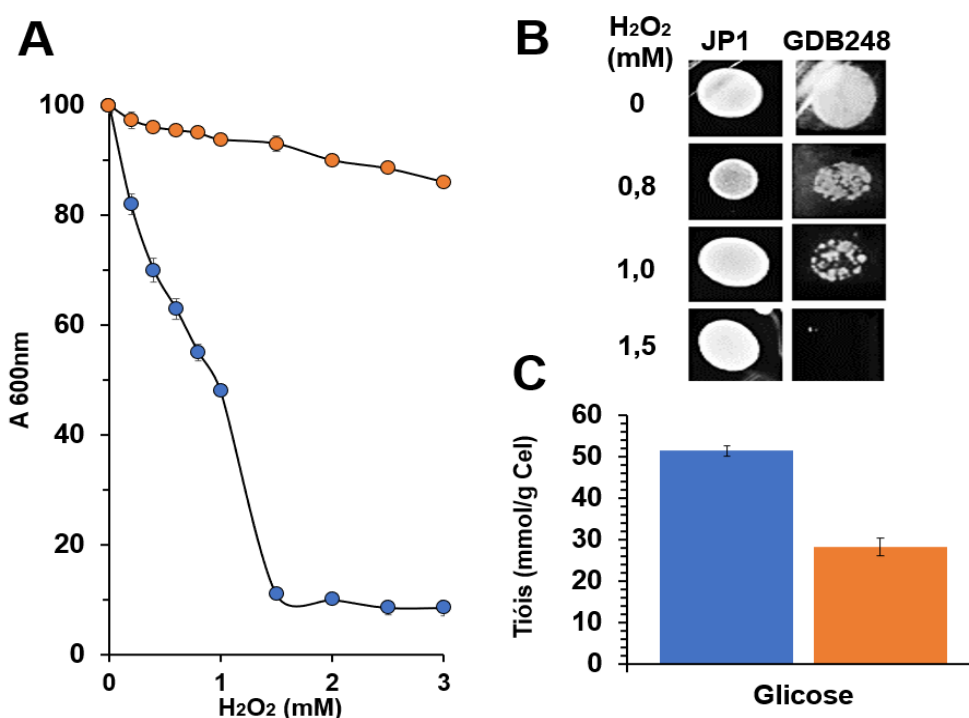


Figura 1. Perfil de sensibilidade da levedura GDB 248 em diferentes concentrações de H_2O_2 . Painel A - Crescimento celular estimado na diferença da DO ($DO_{Final} - DO_{inicial}$) em espectrofotômetro a 600nm, após 48h de ensaio em meio líquido sintético YNB contendo glicose (20 g/L) em sulfato de amônio (5 g/L), das leveduras GDB 248 (círculo azul) e JP1 (círculo laranja). Painel B - Testes de viabilidade celular em placa com meio YPD-Ágar padrão após 48h de crescimento para as leveduras GDB 248 e JP1. Antes de serem semeadas na placa, as células foram pré-tratadas em concentrações crescentes do H_2O_2 (0,2 mM, 0,5 mM 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 Mm) em solução salina NaCl; 0,85% m/v sob agitação constante por 60 minutos. Painel C - Quantificação do conteúdo de sulfidríla livres totais (proteicos e não proteicos) expressos em mmol/gCel das leveduras GDB 248 e JP1 em glicose. A barra azul representa a levedura GDB 248 e a barra laranja apresenta a levedura JP1. A condição referência foi utilizado somente com o meio contendo a levedura teste para obtenção do padrão de crescimento.

5.2 A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS SULFIDRILADAS DURANTE O METABOLISMO RESPIRATÓRIO PROTEGE *D. BRUXELLENSIS* GDB 248 CONTRA H₂O₂

Diferentes fontes de carbono podem afetar de maneira específica o metabolismo celular entre a respiração e a fermentação (Kurtzmann et al., 2011). Em *S. cerevisiae*, a galactose pode ser assimilada a partir do metabolismo respiro-fermentativo ou pelo metabolismo estritamente respiratório em diferentes linhagens. A assimilação desse açúcar se dá através da via de Leloir, na qual a galactose é convertida em galactose-1-fosfato com o consumo de uma molécula de ATP e subsequentemente transformado em glicose-6-fosfato para entrada na via glicolítica (Holton et al, 2001). Estudos recentes realizados pelo nosso grupo utilizando a linhagem GDB 248 (dados ainda não publicados) e o estudo de Moktaduzzaman et al. (2015) com a linhagem CBS 2499 mostraram que galactose é assimilada por um metabolismo estritamente respiratório em *D. bruxellensis*, indicado pela ausência da produção de etanol. Portanto, no presente estudo utilizamos glicose como a hexose que induz o metabolismo respiro-fermentativo e galactose como a hexose que induz metabolismo estritamente respiratório.

Experimentos de viabilidade celular em placa mostraram que a metabolização desses açúcares produziu uma diferença marcante na sensibilidade das células de GDB 248 ao H₂O₂, com manutenção da viabilidade celular em galactose semelhante a condição de referência mesmo na presença de 1,5 mM do agente estressor, concentração que praticamente inviabiliza as células em glicose (Fig. 2A). A viabilidade de GDB 248 é mantida mesmo em concentrações de H₂O₂ tão altas quanto 3 mM (Fig. 2A). Não houve influência do tipo de açúcar na tolerância de JP1 (Fig. 2A).

A quantificação de tióis totais foi comparada entre as células de GDB 248 cultivadas em glicose e em galactose. A Fig. 2B mostra que 98% (50,4 mmol/gCel) dos 51,3 mmol/gCel dos tióis totais de GDB 248 cultivada em glicose encontram-se na sua forma não-protéica, ou seja, na forma reduzida da molécula de glutathione (GSH).

As células cultivadas em galactose apresentaram 20% a mais de tióis totais (60,7 mmol/gCel) do que as células em glicose (Fig. 2B). Além disso, essas células apresentaram a expressiva produção de tióis proteicos calculados em 28,7 mmol/gCel, representada pela produção de proteínas altamente sulfidriladas como as tioredoxinas.

Sendo assim, seria este mecanismo compensatório na síntese de proteínas antioxidantes a justificar para a habilidade da célula em lidar melhor com o H_2O_2 em galactose?

Em seguida foram realizados experimentos de quantificação de EROs produzidos pela GDB 248 cultivada em glicose ou galactose. Os resultados mostraram maior produção de EROs (>30%) pelas células cultivadas em galactose do que em glicose (Fig. 2C). Isso era esperado pelo fato de que a galactose é apenas metabolizada via respiração nesta linhagem, o que induz a produção de EROs pela redução incompleta do oxigênio molecular para cadeia respiratória. A adição exógena de GSH na concentração de 1 mM foi feita com base em estudos prévios mostrando seu efeito protetor antioxidante em *S. cerevisiae* (Teles et al., 2018; Hatem et al., 2014). No entanto, a presença da GSH no meio não alterou o padrão de detecção de ROS em nenhuma das fontes testadas (Fig. 2C).

A partir desses resultados, avaliamos o perfil de expressão de quatro genes (*SOD*, *GPX*, *GSH* e *YAP*) codificadores de enzimas relacionadas com a produção dessas formas tiólicas e sua utilização para a proteção celular com estresse oxidativo. O metabolismo respiratório produz as EROs, dentre as quais se destaca o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é capaz de produzir diferentes tipos de danos oxidativos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. A detoxificação desse EROs é realizada por uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase codificada pelos genes *SOD* para converter superóxido a H_2O_2 (Han et al., 2001; Culotta, 2006; MENG et al., 2017). *S. cerevisiae* possui duas isoformas Sod: Sod1 localizada no citosol e no espaço intermembrana mitocondrial que é dependente de cobre e zinco e Sod2 localizada na matriz mitocondrial e dependente de manganês (CULOTTA et al., 2006). A Sod2 desempenha um papel central na desintoxicação do superóxido produzido pela cadeia respiratória mitocondrial.

A molécula de H_2O_2 produzida não é considerada um radical por não apresentar elétrons desemparelhados. No entanto, pode reagir com metais de transição como os íons de ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+) para a formação da espécie radicalar hidroxil ($OH^{\bullet}$) (Halliwell e Gutteridge, 2007; D'autréaux e Toledano, 2007). Em seguida, as moléculas de H_2O_2 produzidas, além de hidroperóxidos orgânicos formados, são reduzidas a água pela glutathione peroxidase (Gpx), codificada pelo gene *GPX*, utilizando o potencial redutor da GSH (Herbette et al. 2007; Margis et al. 2008; Morano et al., 2012). Portanto, a quantidade de GSH disponível é relevante para a proteção celular

contra esses agentes estressores, contudo é dependente da ativação do sistema Gpx (Islã et al. 2015; Zhang et al. 2018; Zhou et al. 2018b; Tian et al., 2021). Nesse caso, duas moléculas de GSH são utilizadas para reduzir uma molécula de H_2O_2 a duas moléculas de H_2O , gerando uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG) (Li et al., 2020; Kojer et al., 2012). E finalmente, a molécula de GSSG é reduzida por duas moléculas de NADPH pela glutathiona redutase (Gr) para restaurar o pool de GSH celular (Tian et al., 2021). A disponibilidade interna de GSH é mantida pela via de síntese *de novo* que tem como reação final a ligação entre uma molécula de γ -glutamilcisteína com uma glicina para formar uma GSH. Essa reação é catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase codificada pelo gene *GSH1*, responsável por manter os níveis de GSH necessários para manutenção da homeostasia celular (Grant et al., 1996; Kistler et al., 1998; Kumar et al., 2011). A regulação desse mecanismo de resposta e proteção a estresse oxidativo é principalmente comanda pela proteína Yap1, produto do gene *YAP1*, que é um fator de transcrição que atua na ativação de um grupo de genes que captam o estado redox intracelular através do aumento de grupamentos tióis oxidados (Kuge et al., 1997; Delaunay et al., 2002). O acúmulo no núcleo de Yap1 ativa a expressão dos genes de defesa antioxidante, tais como *CTT1*, *GPX* e *TRX*, representando a mais importante em defesa a ação de peróxidos orgânico em geral (Tachibana et al., 2009; Iwai et al., 2010).

A expressão relativa dos genes testados foi avaliada em células cultivadas em galactose (condição que induz tolerância ao H_2O_2) em relação ao cultivo em glicose (Fig. 2D). Os resultados mostraram a sobre-expressão de quatro vezes de *SOD1* e de seis vezes de *GPX1* no meio com galactose mesmo na ausência do tratamento com H_2O_2 . Isso indica que a indução do metabolismo respiratório pela galactose ativa o sistema de proteção contra H_2O_2 , possivelmente devido ao aumento na produção de EROs (Fig. 2C), tornando as células mais tolerantes aos efeitos tóxicos de agentes oxidantes. Essa indução coincide com a sobre-expressão de duas vezes do gene *YAP1*, indicando que a metabolização da galactose desreprime o mecanismo de resposta a estresse oxidativo em relação ao cultivo em glicose, tal como acontece em *S. cerevisiae* (Ostergaard et al., 2000). Também houve a sobre-expressão do gene *GSH1* (1,8 vezes) mais em galactose do que em glicose, indicando que as células tendem a aumentar o pool intracelular de GSH para proteção contra estresse oxidativo. No entanto, essa resposta parece ser apenas parte de mecanismo regulatório geral, mas não essencial na resposta ao peróxido de hidrogênio, já que a

adição de GSH no meio de cultura não contribuiu para diminuir a produção de EROs durante o crescimento celular tanto em glicose quanto em galactose (Fig. 2C).

Para confirmar o efeito do metabolismo respiratório sobre a tolerância da levedura ao H_2O_2 , experimentos foram realizados em células cultivadas em outras fontes de carbono estritamente respiráveis, tais como glicerol e o citrato. O citrato pode ser usado como fonte de carbono e/ou energia para fornecer intermediários para a formação de biomassa (Laétitia et al., 2014) e uma vez dentro da célula, entra diretamente no ciclo do tricarboxílico (TCA) para gerar equivalentes redutores sob a forma de NADH e $FADH_2$, utilizáveis pela cadeia respiratória para gerar energia acionando o predomínio do metabolismo respiratório (Kowalczyk et al., 2016).

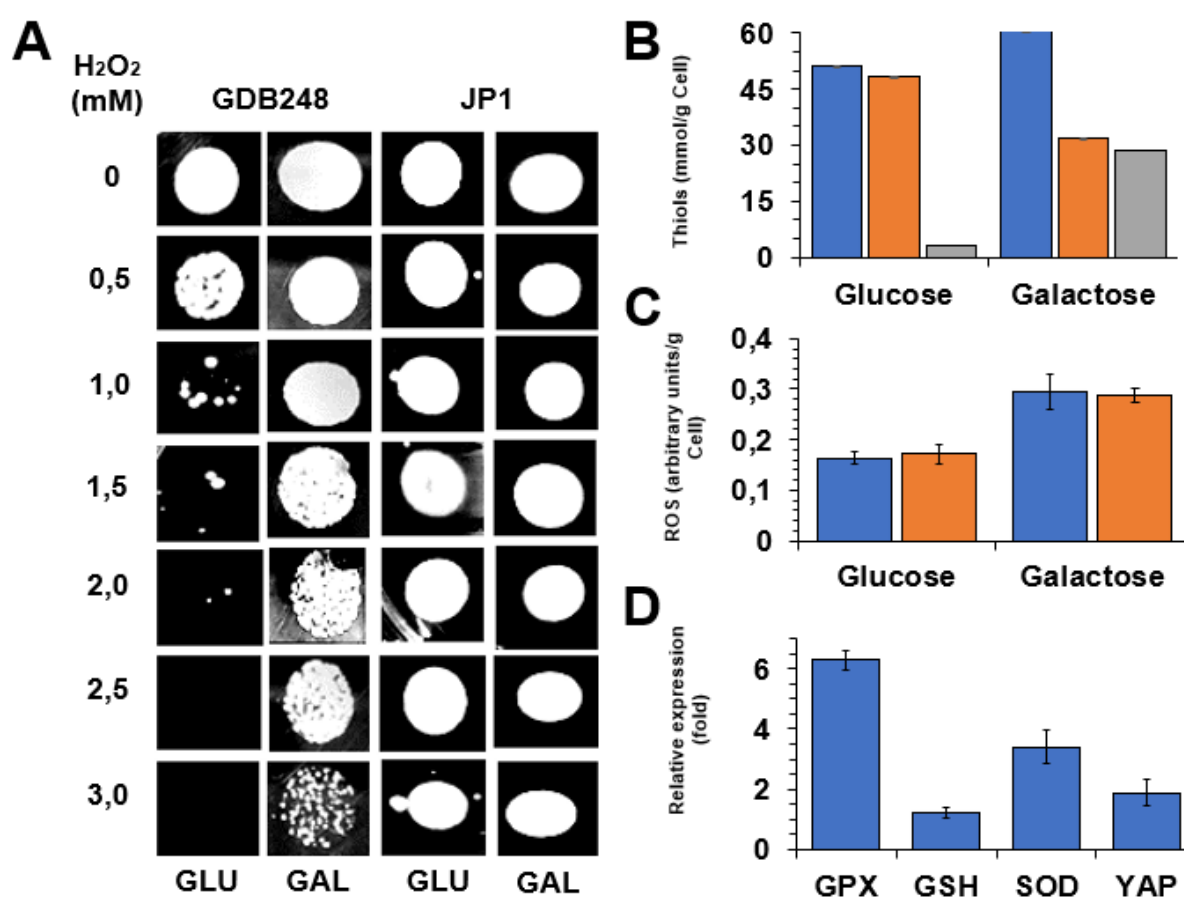


Figura 2. Efeito da galactose na resposta de *D. bruxellensis* GDB 248 ao estresse induzido por H_2O_2 . Painei A - Testes de viabilidade para a levedura GDB 248 e JP1 em glicose e galactose expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar padrão de viabilidade. Painei B - Quantificação de tióis citosólicos expressos em mmol/gCel da levedura GDB 248. A barra azul representa os grupamentos sulfidríla livres totais (proteicos e não proteicos), a barra laranja os grupamentos sulfidríla livres não proteico e a barra cinza os grupamentos sulfidríla livres proteico. Painei C - Quantificação de EROs pelas células de GDB 248 expressos em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em amônio e a barra laranja os resultados de amônio/GSH. Painei D - Expressão gênica em tempo real para os genes *GPX*, *GSH1*, *SOD1* e *YAP1* de GDB 248 em galactose/amônio sobre glicose/amônio como condição calibradora.

A metabolização do glicerol como fonte de carbono requer primeiramente sua entrada na célula que pode ocorrer por transporte passivo ou ativo através da membrana citoplasmática (Luyten et al, 2005). Na célula, o glicerol pode ser fosforilado a glicerol-3-fosfato (G3P) ou convertido em dihidroxiacetona, a qual é, posteriormente, fosforilada em dihidroxiacetona fosfato com a produção de um NADH. Uma via alternativa para a produção de dihidroxiacetona fosfato se dá pela oxidação do glicerol-3-fosfato, produzido na célula, gerando uma molécula FADH_2 . Ambos, o NADH e o FADH_2 , produzidos na via metabólica do glicerol, são direcionados a mitocôndria para o ciclo do TCA, no qual ocorre a produção de ATP e a reciclagem dos transportadores de elétrons (Lages et al, 1999).

Os experimentos de viabilidade celular em placa mostraram que a metabolização de citrato e glicerol (Fig. 3A) inclusive superou a resistência das células de GDB 248 ao H_2O_2 em galactose (Fig. 2A) e este perfil de tolerância foi semelhante ao apresentado pela levedura JP1 (Fig. 2A). A quantificação de tióis totais também foi realizada para as células de GDB 248 cultivadas em citrato e glicerol. Nessas condições as células apresentaram 52,75 mmol/gCel e 53,19 mmol/gCel dos tióis totais, respectivamente, sendo este valor aproximado ao apresentado em glicose, de 51,34 mmol/gCel. Contudo, diferentemente da condição com glicose, essas células apresentaram a expressiva produção de tióis protéicos calculados em 28,08 mmol/gCel para células cultivadas em citrato e 32,91 mmol/gCel em glicerol. Sendo assim, estes resultados confirmam a capacidade que as fontes respiráveis têm em ativar a síntese de proteínas sulfidriladas (tioredoxinas) e isto torna as células capazes de resistir a presença de oxidantes externos.

As células de GDB 248 também foram cultivadas em citrato e glicerol para a realização da quantificação de EROs. Os resultados mostraram que a produção de EROs foi maior em fontes respiráveis, como o citrato e o glicerol, do que em glicose, fonte respiro-fermentativa (Fig. 3C). Estes resultados confirmam o mostrado na produção de EROs por galactose (Fig. 2C). Além disso, a presença da GSH no meio contendo citrato e glicerol também não foi capaz de alterar a produção das EROs (Fig. 2C). Portanto, conclui-se que apesar do metabolismo respiratório vir acompanhado da produção de EROs, as células de GDB 248 quando submetidas a fontes de C que induzem o metabolismo respiratório são mais tolerantes à presença de agentes oxidantes externos do que quando submetidas ao metabolismo respiro-fermentativo, semelhante ao que foi relatado para *S. cerevisiae* (Halliwell and Gutteridge, 2010).

Essa tolerância parece estar relacionada com a presença de proteínas sulfidriladas e não com a disponibilidade de sulfidrilas não protéicas, como presentes na GSH. Portanto, concluímos que o aumento da resistência pela levedura GDB 248 à presença de H_2O_2 em meio com fontes respiráveis é o resultado de uma reprogramação da maquinaria celular induzida pela respiração, a qual induz a expressão dos genes do mecanismo de defesa mediado por Gpx e a produção de proteínas antioxidantes, como as tioredoxinas, que protege a célula e contribuir para a manutenção equilíbrio redox. A ausência dessa resposta em glicose pode ser devido ao efeito de repressão catabólica exercida pelo açúcar na indução da resposta antioxidante da levedura.

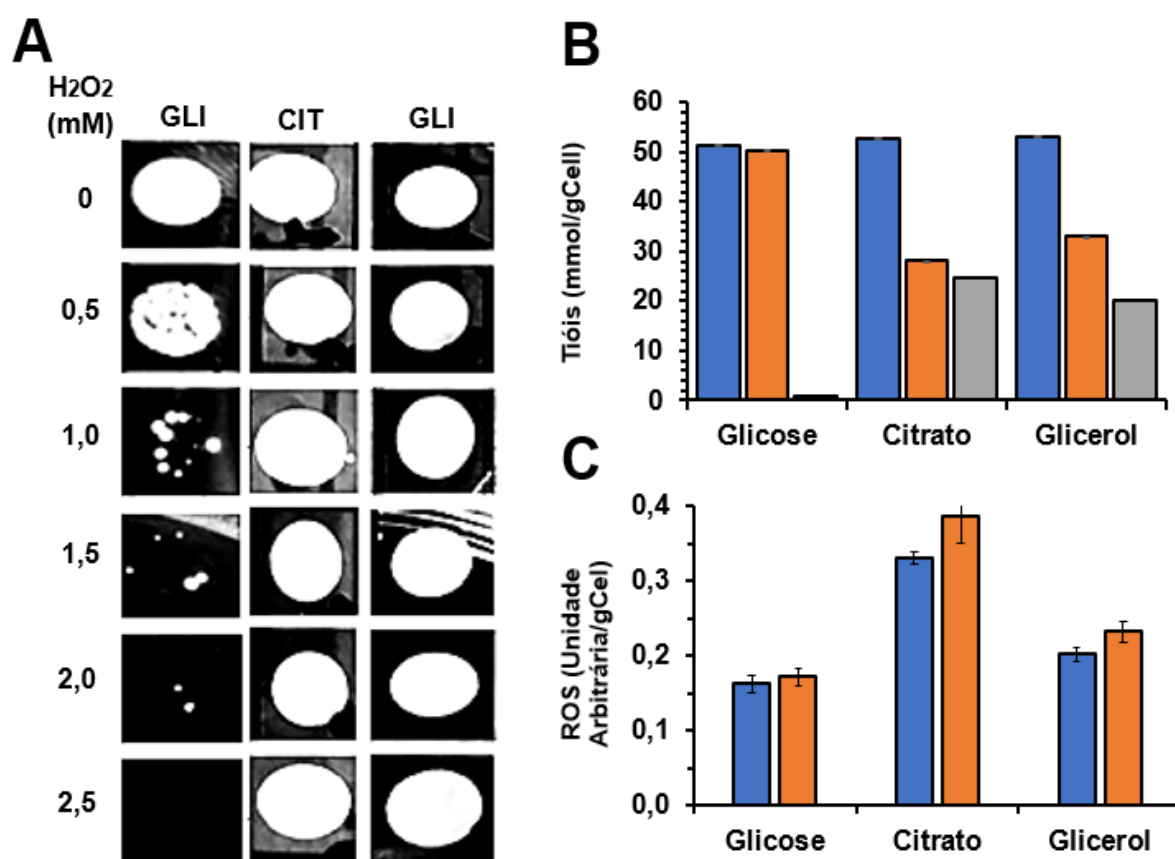


Figura 3. Efeito do citrato e do glicerol como fontes restritamente respiráveis na resposta ao estresse por H_2O_2 em *Dekkera bruxellensis* GDB 248. Painel A - Testes de viabilidade realizados para a levedura GDB 248 em glicose, citrato e glicerol expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar padrão de viabilidade. Painel B - Quantificação de tióis citosólicos expressos em mmol/gCel da levedura GDB 248. A barra azul representa os grupamentos sulfidrila totais (proteicos e não proteicos); a barra laranja representa os grupamentos sulfidrila livres não proteico; e a barra cinza representa os grupamentos sulfidrila livres proteico. Painel C - Quantificação de EROs na célula de GDB 248 expressos em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul são os resultados em amônio e a barra laranja em amônio/GSH (C).

5.3 NITRATO POTENCIALIZA A AÇÃO TÓXICA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM *D. BRUXELLENSIS* GDB 248

Uma característica fisiológica relevante de *D. bruxellensis* é a sua capacidade de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio (de Barros Pita et al. 2011; 2013; Galafassi et al., 2013; Cajueiro et al., 2017). No entanto, o crescimento celular em aerobiose é menor do que o observado quando amônio é utilizado como fonte de nitrogênio. Essa constatação nos levou a classificar o nitrato como fonte secundária (Cajueiro et al., 2017; Parente et al., 2017) e a explicação se baseava na alta demanda energética para sua metabolização, com a demanda de quatro moles de NADPH para a conversão do nitrato ao amônio e mais um mol de NADPH para a assimilação do amônio a glutamato (Siverio, 2002; Galafassi et al. 2013). No entanto, pesquisas recentes mostraram que o nitrato se torna uma fonte mais assimilável para esta levedura sob condições de anaerobiose, capaz de aumentar tanto a taxa de crescimento celular como o rendimento de etanol para os níveis observados em cultivos com amônio (Peña-Moreno et al., 2019). Em seguida, foi relatado que a deficiência no crescimento aeróbio está relacionada com a indução de relevante estresse oxidativo indicado pela sobre-produção de enzimas como a catalase citosólica, acompanhado da sobre-expressão de seu gene codificador *CTT1*, e a oxido nítrico redutase (Peña-Moreno et al., 2021).

Portanto, a presença de nitrato deve aumentar a produção de EROs pelas células que estão respirando. Em face disso, avaliamos a resposta de GDB 248 ao H_2O_2 em quatro combinações nutricionais possíveis: glicose/amônio, glicose/nitrato, galactose/amônio e galactose/nitrato (Fig. 4). Os resultados mostraram que o nitrato aumentou a sensibilidade da célula ao H_2O_2 quando comparado em amônio. Este efeito foi mais evidente nas células cultivadas em galactose, devido a alteração completa do estado de resistência ao H_2O_2 , deixando a célula mais sensível do que na presença de glicose (Fig. 4A). Portanto, parece haver um efeito sinérgico entre a maior produção de EROs diretamente pelo metabolismo respiratório com a produção de EROs, ou de óxido nítrico, durante a redução do nitrato ao amônio. De fato, foi observado que a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio, independente da fonte de carbono, incrementa a produção de EROs em mais de 40% (Fig. 4B) em relação às células cultivadas em amônio (Fig. 2C). Esse resultado corrobora a conclusão de que o metabolismo do nitrato em aerobiose causa estresse oxidativo devido ao

aumento da produção de EROs (Peña-Moreno et al., 2021). Esse alto nível de agentes oxidantes deve extrapolar a capacidade do sistema de defesa, tornando as células mais sensíveis ao H_2O_2 , mesmo em galactose. Além disso, foi possível notar que a adição de GSH ao meio de cultura não foi capaz de reverter o estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 em nitrato (Fig. 4B), assim como observado em amônio (Fig. 2C). Mostrando mais uma vez que a tolerância à presença do H_2O_2 por GDB 248 independe do aumento do pool intracelular de GSH.

A produção de EROs pelo metabolismo do nitrato foi também atestada pela expressão dos genes de defesa antioxidante, medida pela expressão dos genes *GPX*, *GSH1*, *SOD1* e *YAP1* nas diferentes condições de cultivo. Esses quatro genes apresentaram aumento da expressão entre 2,5 e 5 vezes em glicose/nitrato relativa ao cultivo em glicose/amônio (Fig. 4C), mostrando que o nitrato induz o sistema de defesa antioxidante mesmo em glicose. Esse perfil de expressão foi muito alterado quando galactose foi utilizada como fonte de carbono. Nesse caso, foram observadas a sub-expressão dos genes *GPX1* e *SOD1* em nitrato em relação ao amônio (Fig. 4D). Isso pode explicar a mudança do estado tolerante para o estado sensível ao H_2O_2 das células cultivadas em galactose e amônio em relação às células cultivadas em galactose e nitrato (Fig. 3A). Por outro lado, foram observadas a sobre-expressão de 33 vezes do gene *GSH1* e de quase cinco vezes do gene *YAP1* (Fig. 4D).

Essa resposta parece ser um mecanismo de compensação das células de *D. bruxellensis* a ausência do sistema principal de defesa composto por Sod1-Gpx1. Nesse caso, mesmo o aumento do pool intracelular de GSH é incapaz de proteger as células de GDB 248 contra o H_2O_2 . Esse mesmo quadro de expressão gênica também foi observado quando comparamos a quantidade de transcritos presentes nas células cultivadas em galactose/amônio sobre as células cultivadas em glicose/amônio (Fig. 4D). Isso mostra que a sub-expressão dos genes *GPX1* e *SOD1* em galactose deve ser a explicação para a sensibilidade ainda maior ao H_2O_2 das células em galactose em relação a glicose quando cultivadas em nitrato (Fig. 4A).

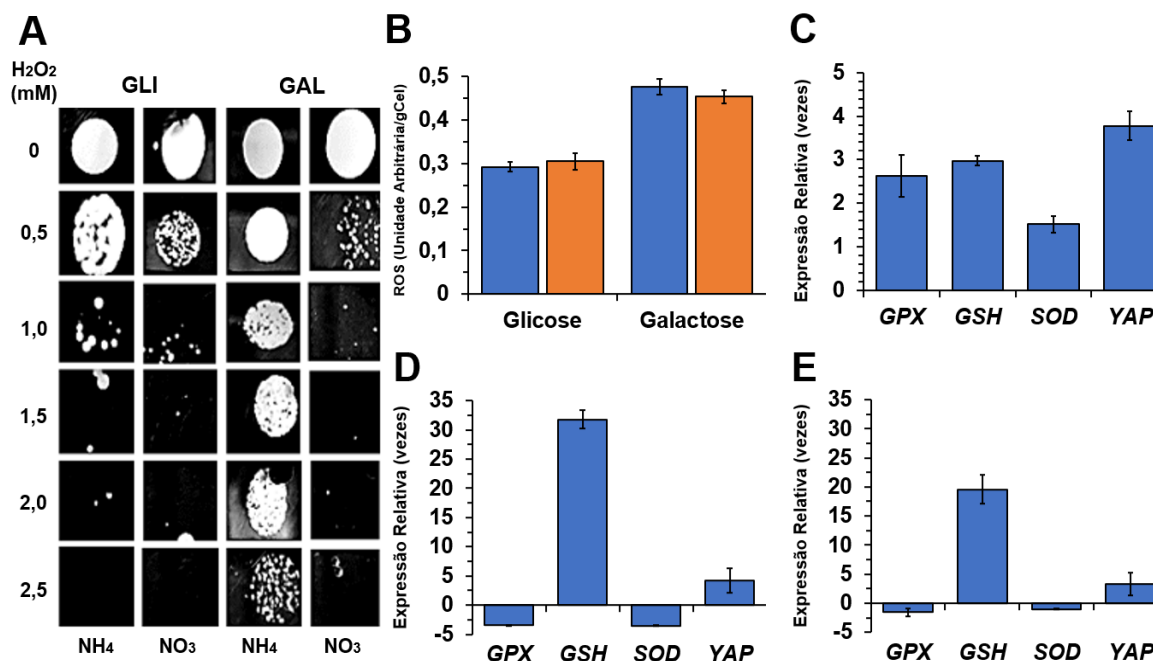


Figura 4. Influência do nitrato sobre a viabilidade celular da levedura GDB 248 na presença do H₂O₂. Painel A - Testes de viabilidade realizados para a levedura GDB 248 e JP1 em glicose, como fonte carbono respiro-fermentativa, e galactose, fonte de carbono estritamente respirável, expostas a concentrações crescentes de H₂O₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar o padrão de viabilidade. Painel B - Quantificação de ROS na célula de GDB 248 expressa em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em NO₃ e a barra laranja os resultados de NO₃ + GSH, em suas respectivas fontes. Painel C - Expressão gênica em tempo real para os genes *GPX*, *GSH1*, *SOD1* e *YAP1* de GDB 248 em glicose/nitrato sobre glicose/amônio. Painel D - Expressão gênica relativa em galactose/nitrato sobre galactose/amônio.

A partir desses resultados, concluímos que a diminuição da expressão de *GPX* em nitrato, associada a ausência de indução de *SOD1*, estão envolvidos com a diminuição da tolerância ao peróxido em galactose. Sendo assim, o mecanismo de tolerância de GDB 248 depende, exclusivamente, do aumento da expressão do gene *GPX1* associado a capacidade que a célula tem em direcionar uma parcela significativa do conteúdo total de tióis livres para a produção de proteínas ricas em conteúdo de tióis (Fig. 2B). Outro ponto relevante é que os dados indicam que a expressão de *GSH1* parece ser regulada pela proteína Yap1 em condições de crescimento sem a adição de agentes oxidantes externos, já que há uma co-regulação desses genes, enquanto que a regulação de *GPX1* e *SOD1* deve estar submetida a outro mecanismo de controle em *D. bruxellensis*. Isso mostra a diferença na resposta a estresse oxidativo entre *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, já que na primeira a expressão de *GPX1* é regulada por Yap1 (Tachibana et al., 2009; Iwai et al., 2010).

O perfil de expressão gênica sob estresse oxidativo foi avaliado após a incubação das células por 60 minutos com H₂O₂ à 1,0 mM definida como dose sub-

CIM. As células foram cultivadas nas quatro condições de meio de cultivo e tratadas no mesmo meio na presença de H_2O_2 e na ausência do agente (condição de referencia) (Fig. 5). A sobre-expressão de *GPX1* foi observada em todas as condições testadas na presença de H_2O_2 (Fig. 5), com destaque para a significativa expressão (>180 vezes) em galatose/amônio (Fig. 5C). Isso corrobora a hipótese de que a glutathiona peroxidase é o principal mecanismo de defesa contra H_2O_2 em *D. bruxellensis* e que este gene é inibido pela glicose (ou induzido pela respiração). Por outro lado, ocorreu apenas um discreto aumento ou mesmo diminuição na expressão de *SOD1*, nas quatro condições de cultivo (Fig. 5). Isso mostra que a expressão de *SOD1* já é alta nas células de *D. bruxellensis*, provavelmente devido a maior atividade respiratória das células (Leite et al., 2013), e que não é aumentada pela presença de H_2O_2 . Portanto, embora tenha havido aumento na produção de transcritos de *SOD1* em nitrato em relação a amônio nos cultivos com glicose (Fig. 5C), a expressão desse gene parece ser constitutiva, ou apresentar baixo nível de regulação, nessa levedura.

A expressão do gene *GSH1* foi apenas um pouco elevada em células cultivadas em glicose na presença de H_2O_2 , independente da fonte de nitrogênio (Fig. 5A,B). Isso mostra que a simples presença de nitrato já foi suficiente para sobre-expressar esse gene (Fig. 5C). O maior nível de expressão foi observado quando as células cultivadas em galactose e amônio foram expostas ao H_2O_2 (Fig. 5C). Isso indica que houve algum tipo de desrepressão de *GSH1* pela ausência de glicose, com efeito sinérgico da presença de nitrato (Fig. 5D,E). Essa alta expressão basal em galactose deve ser a explicação para o fato de que o nível de transcrição de *GSH1* em nitrato não seja elevado pela presença do H_2O_2 no mesmo nível que em amônio (Fig. 5D). Isso reforça novamente a conclusão de que o nitrato gera estresse oxidativo durante o crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* (Peña-Moreno et al 2020). Esses resultados indicam novamente que a indução da síntese *de novo* de GSH como indicada pela super-expressão de *GSH1* deve representar mais um mecanismo de resposta do que um mecanismo de defesa. Essa maior expressão de *GSH1* ocorreu de maneira independente da expressão de *YAP1*, que não foi alterada pela presença de H_2O_2 em amônio e foi diminuída pela presença de H_2O_2 em nitrato (Fig. 5). Portanto, embora haja indícios de que a proteína Yap1 controle a expressão de *GSH1* sob condições de crescimento aeróbio, existe um mecanismo indutor desse gene ativado sob estresse por H_2O_2 que é independente de Yap1. Mesmo porque o próprio gene *YAP1* parece sofrer repressão pela presença de H_2O_2 .

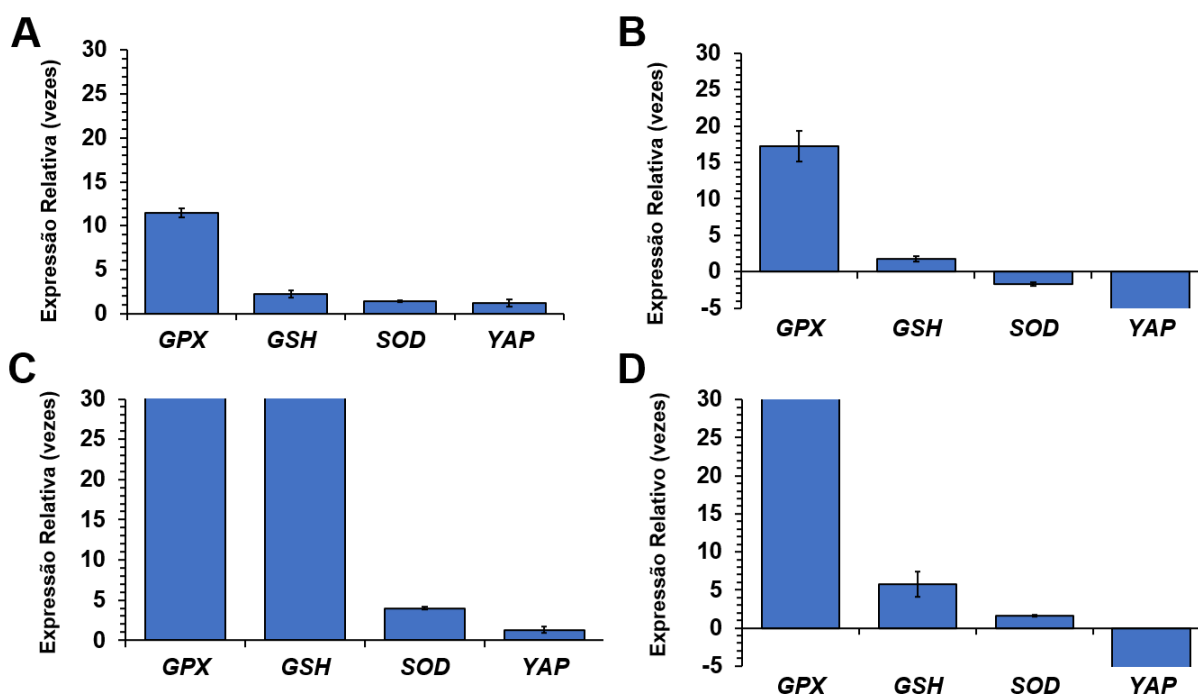


Figura 5. Perfil de expressão de genes de defesa antioxidante em *D. bruxellensis* GDB 248 na presença do H₂O₂. Painel A - Expressão gênica em tempo real para os genes GPX, GSH, SOD e YAP1 em glicose/amônio/H₂O₂ sobre glicose/amônio como condição calibradora. Painel B - Expressão gênica em glicose/nitrato/H₂O₂ sobre glicose/nitrato. Painel C - Expressão gênica galactose/amônio/H₂O₂ sobre galactose. Painel D - Expressão gênica galactose/nitrato/H₂O₂ sobre galactose/nitrato.

Experimentos de viabilidade celular foram realizados com nitrato e amônio em metabolismo respiratório na presença de citrato e glicerol (Fig. 6). A condição com glicose foi utilizada como referência para todas as condições. Os resultados mostraram que o nitrato aumentou a sensibilidade da célula ao H₂O₂ quando comparado em amônio e este efeito foi mais acentuado nas células cultivadas em citrato, deixando a célula mais sensível do que na presença de glicose (Fig. 6A), assim como observado em galactose (Fig. 4A). Os testes de viabilidade realizados em glicerol/nitrato não apresentaram crescimento celular (dados não mostrados). Esses resultados reafirmam os resultados anteriores sobre o potencial gerador de estresse oxidativo como subproduto da assimilação de nitrato (Peña-Moreno et al., 2020).

A quantificação de EROs para estas fontes de carbono (citrato e glicerol) também reafirmam que a presença nitrato como fonte de nitrogênio aumenta a produção de EROs, sendo duas vezes maior em citrato do que glicose, além de ser maior em glicerol (Fig. 6B). Portanto, concluímos que a presença de fontes respiráveis como galactose (Fig. 4B), citrato e glicerol (Fig. 6B) aumentam a produção de EROs em relação a presença de fontes fermentáveis, como a glicose. Além disso, independente da fonte de carbono, o metabolismo do nitrato em aerobiose causa

estresse oxidativo devido ao aumento da produção de EROs (Peña-Moreno et al., 2021). Aliado a isso, a adição de GSH ao meio de cultura com citrato ou glicerol também não foi capaz de reverter o estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 em nitrato (Fig. 6B), assim como observado em amônio para todos os resultados anteriores.

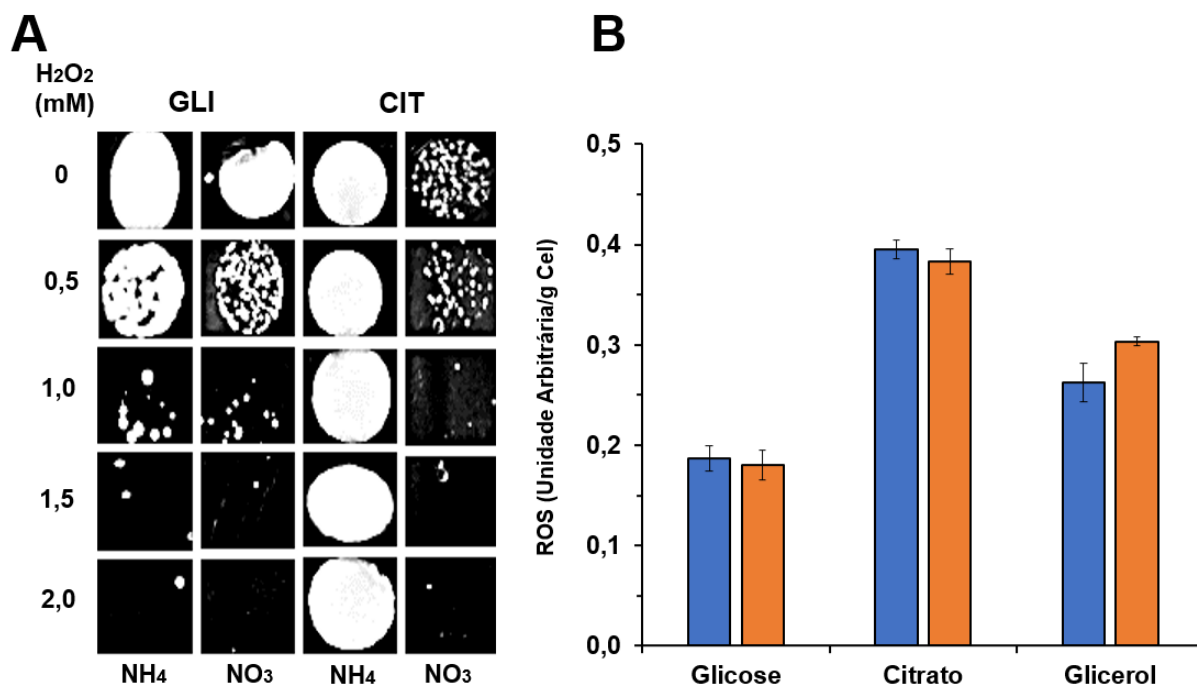


Figura 6. Efeito do nitrato sobre a viabilidade das células de *D. bruxellensis* GDB 248 na presença do H_2O_2 em citrato ou glicerol como fontes de C. Painel A - Testes de viabilidade realizados para GDB 248 em glicose e citrato expostas a concentrações crescentes de H_2O_2 (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM). A condição referência foi utilizada somente com a levedura para avaliar o padrão de viabilidade. Painel B - Quantificação de EROs nas células de GDB 248 expressa em unidades arbitrárias/gCel. A barra azul apresenta os resultados em nitrato e a barra laranja os resultados de nitrato/GSH.

5.4 A PRESENÇA DO ANTIOXIDANTE GSH AUMENTA A SENSIBILIDADE DE *D. BRUXELLENSIS* GDB 248

O real papel de GSH na defesa antioxidante em GDB 248 foi testado pela adição exógena dessa molécula em meio contendo H_2O_2 (Teles et al., 2018). Para isto, as células cultivadas foram coletadas, pré-tratadas com H_2O_2 e submetidas a concentrações crescentes de GSH até 1 mM por até 60 min (Teles et al., 2018; Hatem et al., 2014). Os resultados mostraram que a presença da GSH intensificou a queda na viabilidade celular, sendo este efeito tóxico diretamente proporcional ao aumento da sua concentração no meio, com o efeito mais agudo em galactose como fonte de carbono e em nitrato como fonte de nitrogênio (Fig. 7). A presença de 1 mM de GSH

não interferiu na viabilidade celular sem a presença de H_2O_2 . A partir disso, surge o questionamento de como esta molécula, tão importante nos mecanismos de proteção antioxidante, poderia estar aumentando a sensibilidade da célula à presença de estresse oxidativo.

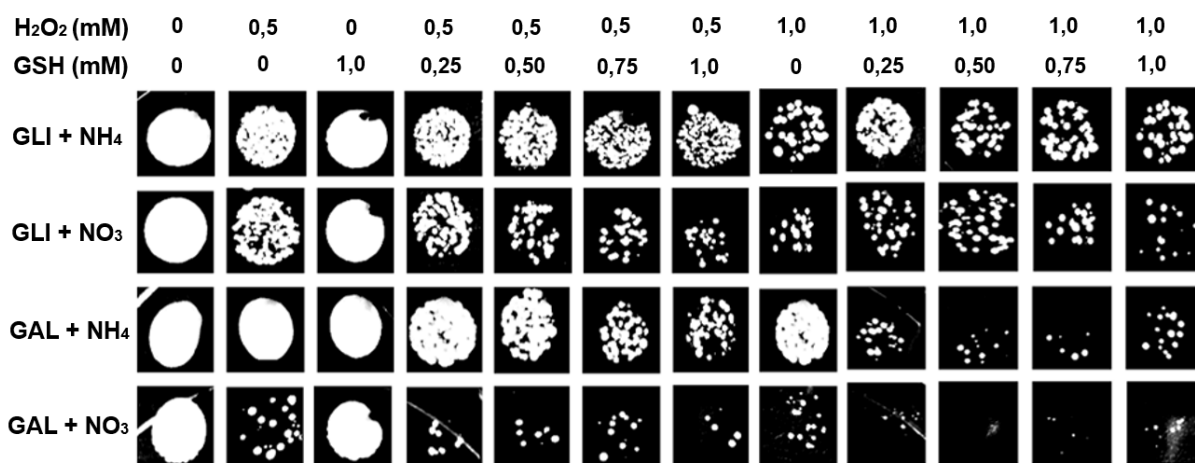


Figura 7. Teste de viabilidade em placa com adição da molécula de Glutathiona reduzida (GSH) na presença de glicose (Fonte respiro-fermentativa) ou galactose (Fonte respirável) como fontes de carbono em combinação com amônio ou nitrato como fontes de nitrogênio. A condição de referência para o crescimento apresenta somente a levedura. A referência para o peróxido de hidrogênio foi testado somente com o agente na condição 0,5 e 1,0mM. A condição referência para o GSH foi utilizado somente contendo o GSH na concentração de 1mM. As concentrações de H_2O_2 foram fixadas em 0,5 e 1,0mM e ambas testadas em concentrações crescentes do GSH de 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM até 1,0 mM.

A manutenção do estado redox intracelular de *S. cerevisiae* não parece depender completamente da concentração de GSH no meio de cultura. Além disso, a elevada concentração intracelular desta molécula parece promover apenas a proteção da levedura contra os efeitos tóxicos (oxidativos) do metabolismo do ferro que é essencial para manutenção do *cluster* Fe-S (Picazo e Molin, 2021; Kumar et al., 2011). No presente trabalho, os resultados mostraram a variação na concentração de GSH não apenas não protege as células da ação tóxica do H_2O_2 como sua disponibilidade no meio de cultura aumentou a toxicidade deste agente, assim como já havia sido relatado na literatura (Kumar et al., 2011. Srikanth et al, 2005; Bourbonnoux et al, 2000). O trabalho publicado por Deffieu et al (2009) mostrou que a adição no meio de cultura de antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC) e a própria cisteína, ambos contendo grupamento sulfidril como o GSH, bloqueou o mecanismo de mitofagia em células de *S. cerevisiae*. Esse mecanismo consiste na eliminação das mitocôndrias danificadas ou não funcionais provenientes de alterações do equilíbrio redox ou pela

atividade do metabolismo oxidativo durante a respiração (Kanki et al., 2015). Portanto, qualquer perturbação que comprometa a finalização desse processo levaria à perda da homeostase celular devido a presença de mitocôndrias em mau funcionamento. Disfunções mitocondriais produzem mudanças em uma série de fatores citosólicos, sendo o principal deles o conteúdo de EROs (Kanki et al., 2015). Este fenômeno de inibição é consequência da repressão do gene *ATG32* que codifica a principal proteína para o início do processo de mitofagia, tal como recentemente reportado pela presença do antioxidante NAC (Xavier et al., 2019). Sendo assim, pode-se considerar que um desbalanço no equilíbrio redox seria gerado através do aumento exacerbado do potencial redutor na célula de GDB 248 pela disponibilidade de GSH no meio de cultivo, somada ao aumento de síntese *de novo* como indicado pelo aumento na expressão de *GSH1* (Fig. 4). Isso teria como principal consequência o bloqueio da mitofagia, com acúmulo de mitocôndrias danificadas, e aumento excessivo da produção de EROs acima da capacidade de defesa das células.

Os resultados apresentados na Figura 1C mostraram que *D. bruxellensis* GDB 248 apresenta elevado conteúdo de sulfidrila livres no meio intracelular, quando comparado ao de *S. cerevisiae* JP1, e essa quantidade seria suficiente para proteger a célula da presença de estresse oxidativo e servir de substrato através da oxidação da GSH para ação de enzimas importantes como GPX e tiorredoxinas. Isto implica em que a manutenção do estado redox intracelular é totalmente dependente da presença de tiorredoxinas. Sendo assim, a molécula de GSH parece necessária em quantidades pequenas e serviria somente como backup para recuperação de tiorredoxinas (Kumar et al., 2011). Deste modo, esse efeito hormético dos antioxidantes em excesso, já observados na literatura (Deffieu et al., 2009; Knorre et al., 2016; Xavier et al., 2019), deve explicar a não reversão do efeito biocida do H_2O_2 em GDB 248. Além disso, esses achados indicam novamente que a indução da síntese *de novo* de GSH observada nos resultados de expressão gênica pela super-expressão de *GSH1* acontece somente por um mecanismo de resposta, não sendo fundamental para a defesa celular. Por conta disso, a adição externa de GSH não interfere no mecanismo de tolerância e na capacidade de restauração do equilíbrio redox na presença do H_2O_2 por GDB 248, o que foi consistente em todos os resultados obtidos.

5.5 A RESPOSTA ADAPTATIVA A ESTRESSE OXIDATIVO NÃO É DISPARADA EM *D. BRUXELLENSIS* GDB 248

Durante o processo de estresse oxidativo, uma série de mecanismos que permitem às células se adaptarem às condições adversas do ambiente é desencadeada, sendo chamados em conjunto de resposta adaptativa. Células de *S. cerevisiae* previamente expostas a baixas concentrações do H_2O_2 induzem a resposta adaptativa que protege as células dos efeitos letais de um desafio subsequente com maiores concentrações desse oxidante (Lee et al, 1999; Branco, 2004; Fernandes et al., 2013; Bayliak et al., 2017). Neste processo, a resposta celular ao H_2O_2 consiste a diversidade de respostas de sinalização celular com ativação de fatores de transcrição, como por exemplo Yap1, e mecanismos de sinalização intracelulares responsáveis pela regulação da expressão de genes com maior especificidade na resposta celular (Hasan et al., 2002, Toledano et al., 2003, Pedroso et al., 2009). Dado que as células de *D. bruxellensis* GDB 248 são mais sensíveis do que as de *S. cerevisiae* JP1 a exposição súbita ao H_2O_2 (Fig. 1), foram realizados ensaios para avaliar a existência de um mecanismo de resposta adaptativa ao estresse oxidativo nesta levedura. Os resultados mostraram que células pré-tratadas com dose de H_2O_2 de 0,15 mM não se tornam resistentes a doses maiores de H_2O_2 e ainda se tornaram até bem mais sensíveis a esse agente (Fig. 8). Esse efeito foi maior em galactose do que em glicose, mesmo que as células sejam mais tolerantes ao H_2O_2 quando cultivadas em galactose e amônio (Fig. 2).

A partir dessas análises, foi possível perceber que a GDB 248 não é capaz de gerar resposta adaptativa que induza um mecanismo de reversão de danos causados H_2O_2 , como já havia sido indicado acima pela semelhança na sensibilidade entre células nas fases exponencial e estacionária de crescimento.

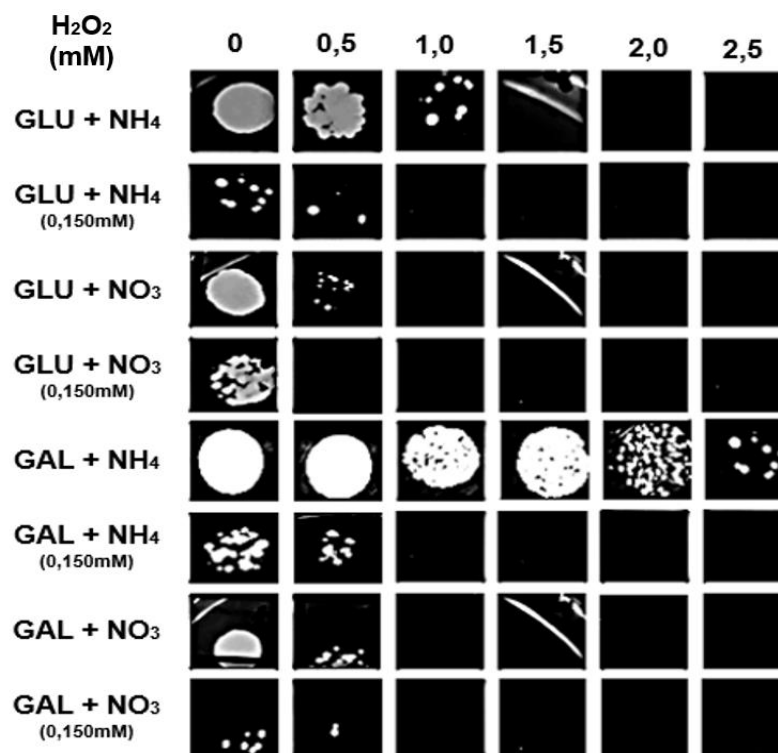


Figura 8. Teste de adaptação de *D. bruxellensis* GDB 248 ao H₂O₂. As células foram cultivadas em glicose (respiro-fermentativa) ou galactose (respirável), como fontes de carbono, em combinação com amônio ou nitrato como fontes de nitrogênio. Estas foram coletadas na fase exponencial do crescimento e submetidas a um pré-tratamento por 60 minutos com dose subletal de H₂O₂ à 150mM. Em seguida, estas mesmas células foram submetidas a doses crescentes e letais de H₂O₂ (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM). As células sem pré-tratamento foram utilizadas como condição referência para a viabilidade celular.

5.6 A RESTRIÇÃO CALÓRICA NÃO TORNA *D. BRUXELLENSIS* GDB 248 MAIS RESISTENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO

Em *S. cerevisiae*, a resposta adaptativa está sob controle do mecanismo de repressão catabólica ativado pela presença de glicose que reprime a expressão dos genes de resposta a estresse enquanto ativa os genes que promovem o crescimento celular e a fermentação. Isto explica a maior resistência a estresse de células cultivadas em fontes oxidativas de carbono (glicerol ou lactato, por exemplo) ou de células em fase estacionária no crescimento em glicose. Nesses dois contextos, as células estão sob restrição calórica que promove maior metabolismo oxidativo, com a síntese de antioxidantes endógenos associados a defesa contra estresse oxidativo, ativação dos sistemas de autofagia e mitofagia e aumentam a longevidade celular replicativa e cronológica (Leonov et al. 2017; Campos et al. 2018; Kayikci e Magwene, 2018). Estudos recentes mostram que a restrição calórica tem sido de grande interesse para atenuar várias respostas induzidas por estresse em diversos

organismos. O trabalho realizado por Alugoju et al (2020) investigou a ação protetora da quercetina sob efeito de restrição calórica e não calórica contra condições de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em mutantes deletados de genes responsáveis pela resposta antioxidante em *S. cerevisiae*, tais como *sod1Δ*, *sod2Δ*, *cat1Δ*, *ctt1Δ*, *tsa1Δ* e *glr11Δ*. Os resultados mostraram que a combinação do antioxidante com a restrição calórica reduziu fortemente o efeito oxidante causado pelo H_2O_2 , mesmo nas células mutantes de levedura, quando comparado com a condição sem restrição calórica.

A partir disso, o efeito da restrição calórica foi testado na levedura GDB 248 sob estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . Os resultados mostraram que a levedura GDB 248 não apresentou aumento na viabilidade celular nas células sob metabolismo calórico restrito (Fig. 9). Estes resultados podem explicar a maior sensibilidade da levedura GDB 248 a presença do H_2O_2 pela ausência de um sistema de defesa adaptativo convencional como o apresentando pela levedura *S. cerevisiae*.

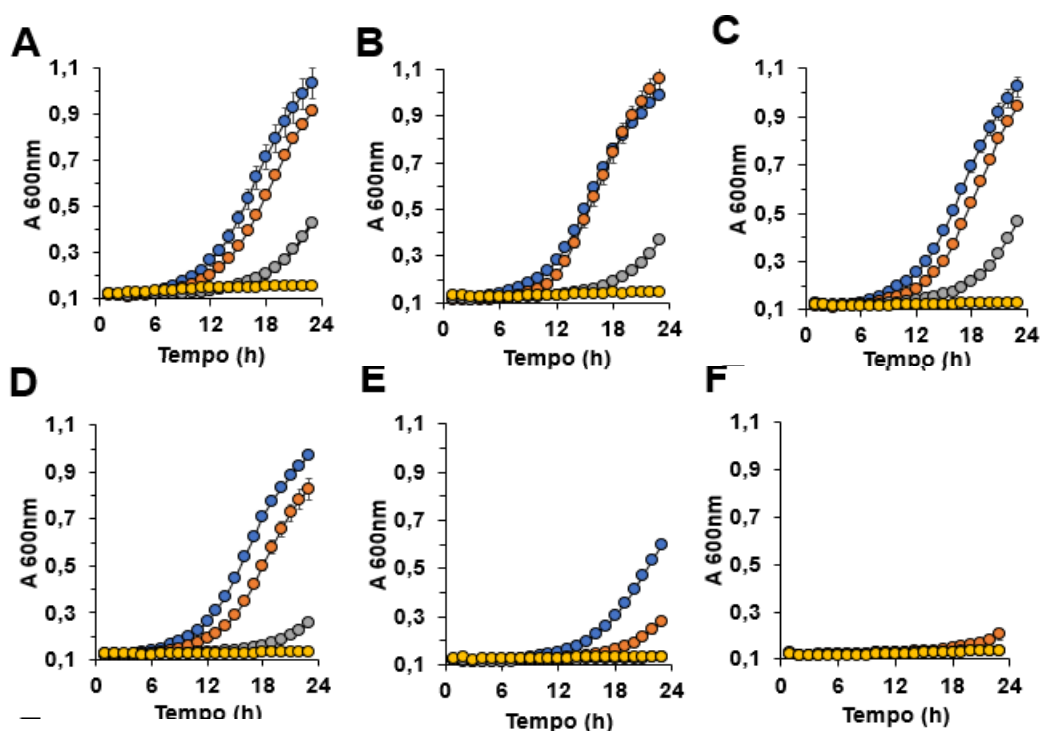


Figura 9. Resposta adaptativa da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 ao estresse oxidativo sob restrição calórica. As células foram cultivadas em glicose nas concentrações de 2 g/L - painéis A e B (condição referência), 0,5 g/L - painéis C e D, e 0,2 g/L - painéis E e F - como condições sob restrição calórica. Painéis A, C e E - em amônio e painéis B, D e F - em nitrato como fontes de nitrogênio. As células foram coletadas na fase estacionária do crescimento e submetidas a concentrações crescentes de H_2O_2 de 0,5 mM (círculos laranjas), 1,0 mM (círculos cinzas) e 1,5 mM (círculos amarelos) e comparados com o crescimento na ausência de H_2O_2 (círculos azuis).

5.7 A RESPOSTA DE *D. BRUXELLENSIS* AO ESTRESSE OXIDATIVO DEPENDE DA ATIVIDADE DAS VIAS PKA E TOR

A vias de sinalização de proteína quinase A (PKA) e da quinase do sistema TOR são altamente conservadas, e respondem a sinais de nutrientes e estresse e regulam várias respostas que governam o crescimento celular. Apesar da via TOR ser essencialmente controlada por aminoácidos, e a PKA responder principalmente à presença da glicose (Hu et al., 2014; Mirzaei et al., 2015; Lee et al., 2015), diversos estudos mostram a existência de uma estreita interligação entre a resposta ativa das duas vias através de proteínas. A maioria dessas proteínas são fatores de transcrição que, em grande parte, explicam as principais respostas transcricionais induzidas após mudanças de nutrientes (Slattery et al., 2007; Bosio et al., 2017; Conrad et al., 2017; Plank, 2022). Uma importante função final compartilhada da sinalização ativa de TOR e PKA é a repressão da resposta ao estresse e a indução a entrada no estado de quiescência observado em *S. cerevisiae* (Plank, 2022).

A ação desses dois mecanismos celulares de controle na regulação da resposta a estresse oxidativo foi avaliado com auxílio de moléculas inibidoras no meio de cultura. A rapamicina é um macrolídeo que se liga a proteína FKBP12 para formação do complexo FKBP12-rapamicina, o qual se liga no complexo proteico 1 do sistema TOR (TORC1) e promove sua inibição (Loewith et al., 2002). A inativação transitória de TORC1 em *S. cerevisiae* leva a desfosforilação dos fatores de transcrição Msn2 e Msn4 e permite que essas proteínas migrem para o núcleo (Plank, 2022). Uma vez no núcleo, estes fatores se ligam a um motivo chamado elemento de resposta ao estresse (STRE) localizado nos promotores de genes do mecanismo de resposta geral ao estresse e induz a transcrição desses genes (Sadeh et al., 2011). Portanto, a inibição de TORC1 deveria desreprimir o sistema de defesa e tornar as células mais resistentes aos agentes estressores.

Ensaio de crescimento celular foram realizados em meio contendo glicose suplementado com rapamicina a 40 ng/mL. O efeito biológico do inibidor nas células de GDB 248 foi verificado a partir da diminuição da cinética de crescimento tanto em amônio (Fig. 10A) como em nitrato (Fig. 10B). Neste caso, a inibição parcial de TORC1 parece ter produzido as alterações fisiológicas convencionais encontradas em *S. cerevisiae* de diminuição da taxa de síntese de proteínas e indução do mecanismo de autofagia que levam a diminuição da progressão do ciclo celular (Plank, 2022). O

efeito da inibição de TOR parece ter sido similar nas duas fontes de nitrogênio, o que é intrigante pelo fato de que o crescimento celular de *D. bruxellensis* em amônio parece ser dependente desse sistema, enquanto que o nitrato parece ativar um sistema regulatório independente (Peña-Moreno et al, 2020). A presença de H₂O₂ produziu queda no crescimento celular em amônio (Fig. 10A) e inviabilizou o crescimento em nitrato (Fig. 10B), como já havia sido observado (Fig. 4). Quando o H₂O₂ e rapamicina foram adicionadas em conjunto, efeitos diferentes foram observados de acordo com a fonte de nitrogênio. Em amônio, houve um efeito sinérgico de forma a praticamente inviabilizar o crescimento celular (Fig. 10A). Nesse caso, o estresse oxidativo provocado pelo H₂O₂ que seria mitigado pela produção de proteínas de defesa como Gpx e Sod foi aumentado supostamente pela diminuição da taxa de síntese proteica produzido pela rapamicina. Isso levaria à inativação do mecanismo de resposta geral ao estresse, tal como proposto para *S. cerevisiae* (Sadeh et al., 2011), mesmo que os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 tivessem sido ativados.

O tratamento com rapamicina assim como a deleção de genes que compõem o sistema TORC1 provocam um pico transitório de produção de EROs mitocondrial em *S. cerevisiae*. Esses radicais produzem um estímulo hormético atuando em dois tipos de respostas biológicas, uma inibitória ao crescimento mediante resposta ao estresse e outra estimulatória da expressão de proteínas envolvidas na resistência ao estresse oxidativo. Sendo assim, a elevação transitória dos níveis de EROs aumentaria a capacidade da célula em responder ao estresse e prolongar sua vida útil (Pan et al., 2011; Pan et al., 2012). Este sinal para o aumento da tolerância ao H₂O₂ induzido por rapamicina não foi observado em GDB 248, mas uma vez corroborando com a hipótese de que não há resposta adaptativa ao estresse oxidativo em *D. bruxellensis*.

O amônio, como fonte preferencial de nitrogênio, ativa fortemente TORC1 e isto faz com que a proteína Gln3 seja fosforilada e mantida no citoplasma pela interação com Ure2p, reprimindo os genes sensíveis a via de regulação catabólica pelo nitrogênio - NCR (Georis et al., 2008). Quando essa fonte preferencial é exaurida, a proteína Gln3 é defosforilada e migra para o núcleo para ativar a expressão dos genes reprimidos pela NCR. Estudos prévios já sugeriam que as células cultivadas com nitrato em aerobiose apresentavam alívio da NCR, simulando a escassez de nitrogênio no meio (Cajueiro et al., 2017). Os resultados mostraram que a presença

do nitrato em rapamicina (Fig. 10B) praticamente não alterou o padrão de crescimento em relação a condição referência, quando comparado ao efeito da rapamicina em amônio (Fig. 10A). Este resultado indica que a sinalização do crescimento celular em nitrato acontece de forma independente de TORC1. Nesse caso, o papel da rapamicina de inibir TOR não afeta a fisiologia da célula, já que em nitrato esta via já parece estar inibida. Sendo assim, o nitrato parece ativar o sistema paralelo de crescimento através da ativação dos genes inibidos por NCR, desregulando e liberando fortemente os mecanismos de assimilação de fontes não-preferenciais, como o nitrato (Peña-moreno, 2020).

Curiosamente, a adição de H_2O_2 junto com a rapamicina promoveu a retomada do crescimento celular em nitrato (Fig. 10B). Este fenômeno poderia ser explicado pelo efeito sinérgico entre a rapamicina e o nitrato que potencializa a ativação dos genes reprimidos por NCR via um mecanismo alternativo e independente de TORC1. Esse mecanismo foi proposto por Peña-Moreno et al (2020) pela análise proteômica comparativa entre células cultivadas em amônio e em nitrato. A partir desses resultados, pode-se especular que a presença do nitrato não inativaria a via TORC1 como proposto acima, mas apenas dissociaria sua função de controle da taxa de síntese proteica em favor desse mecanismo regulatório alternativo. No entanto, a manutenção da atividade da via TORC1 continuaria exercendo papel regulatório negativo sobre o mecanismo de defesa a estresse, tornando as células cultivadas em nitrato mais sensíveis ao H_2O_2 (Fig. 4). Ainda, a presença de rapamicina inativaria TORC1, liberando a resposta geral a estresse num contexto de síntese proteica ativada pela presença de nitrato. Isto promoveria crescimento celular mesmo numa condição tão adversa (Fig. 10B).

A via da proteína quinase A (PKA) em *S. cerevisiae* está envolvida na regulação de diversos processos celulares, incluindo percepção de nutrientes, principalmente a presença de glicose, regulação positiva do crescimento celular e fermentação e negativa da resposta geral a estresse (Santangelo et al., 2006; Lui et al., 2018; Portela e Rossi, 2020). Dois eventos principais são capazes de ativar a via cAMP-PKA: a presença de açúcares fermentáveis, como a glicose, e pela acidificação intracelular (Portela e Rossi, 2020). Quando a glicose do meio é exaurida, a via PKA é parcialmente inibida e os genes que estão sob repressão catabólica pela glicose (GCR) são desreprimidos e o metabolismo oxidativo exclusivo é ativado (Portela e Rossi, 2020).

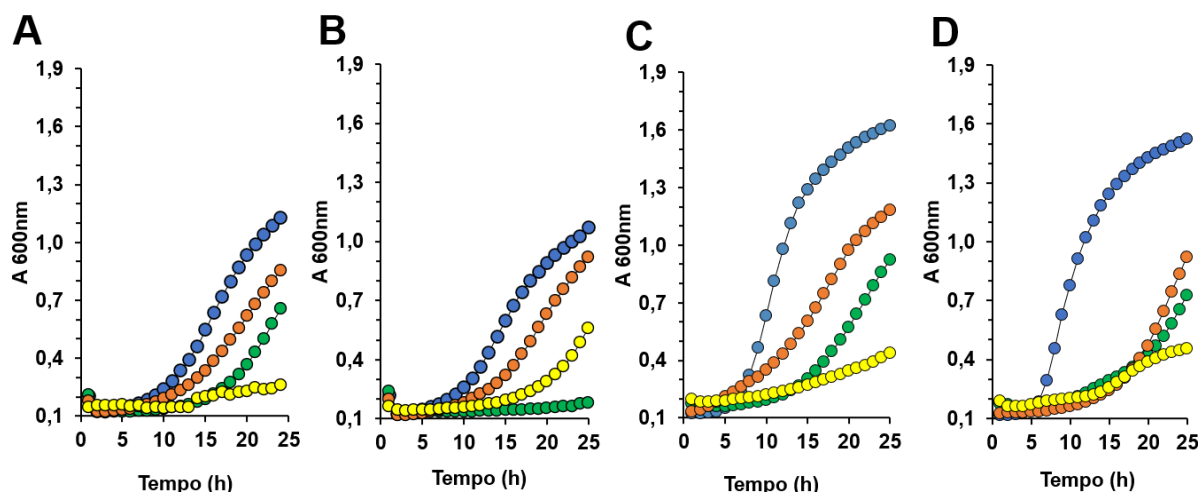


Figura 10. Cinética de crescimento de *D. bruxellensis* GDB 248 em meio YNB contendo glicose em amônio ou nitrato, suplementado com rapamicina a 40 ng/ml ou peptídeo inibidor da PKA a 20 μ mol, na presença de H_2O_2 a 0,5 mM. As células foram cultivadas em glicose e amônio (Painel A) ou em glicose e nitrato (Painel B) na presença ou ausência de rapamicina. As células foram cultivadas em glicose e amônio (Painel C) ou em glicose e nitrato (Painel D) na presença ou ausência do inibidor da PKA. Os símbolos se referem a condição referência (círculos azuis), tratamento com um inibidor (círculos laranjas), H_2O_2 (círculos verdes) ou H_2O_2 com um inibidor (círculos amarelos).

Além dessa inibição metabólica, a via PKA pode ser inibida pela presença de peptídeos sintéticos que se ligam ao sítio ativo da enzima e promovem inibição competitiva da fosforilação dos alvos naturais. Em ambos os casos, dentre os efeitos metabólicos observados podem ser listados a indução dos genes da respiração do ciclo de Krebs, da autofagia e da mitofagia e dos genes de resposta geral a estresse por meio da ativação dos fatores Msn2/4 (Thevelein, 1994; Martinez-Pastor et al., 1996; Gorner et al., 1998; Lui et al., 2018; Estruch, 2000; Longo et al., 2012; Barraza et al., 2017; Plank, 2022). Isso explica a maior resistência das células de levedura a diferentes formas de estresse quando as células entram na fase estacionária, são cultivadas sob restrição calórica ou quando cultivadas em fontes de carbono exclusivamente respiráveis (Estruch, 2000; Longo et al., 2012). No entanto, esse circuito regulatório não parece ser tão alinhado em *D. bruxellensis*, já que a via PKA tem uma atividade basal mais alta nessas células do que em *S. cerevisiae* e não responde tão imediatamente à adição súbita de glicose no meio de cultura (Leite et al., 2013).

Neste sentido, o envolvimento da via PKA na resposta ao estresse por H_2O_2 foi analisado pela adição ao meio de um peptídeo sintético inibidor da PKA na concentração de 20 μ M nos cultivos em glicose com amônio ou nitrato. A presença desse inibidor fez diminuir o crescimento celular em amônio (Fig. 10C) e mais ainda em nitrato (Fig. 10D), mostrando que esse inibidor também atua sobre a PKA de *D.*

bruxellensis. Isso também mostrou que o crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* em glicose também é regulado pela PKA. A resposta mais pronunciada em nitrato não era esperada, já que a inibição de PKA deveria ativar o mecanismo de defesa contra estresse oxidativo que se propõe ser induzido pelo nitrato (Peña-Moreno et al 2020). Mais uma vez os dados apontam para a ausência de um sistema adaptativo que protegeria as células contra danos oxidativos como o que se observa em *S. cerevisiae*.

A presença concomitante do inibidor da PKA e do H_2O_2 promoveu um efeito sinérgico com a diminuição acentuada do crescimento celular quando comparado com cada tratamento isolado (Fig. 10C e D). Diferente do observado na inibição de TORC1, a inibição de PKA em meio com nitrato não protegeu contra o H_2O_2 (Fig. 10D). Nessa condição vale lembrar que a via TORC1 não estaria funcionando para regulação do metabolismo do nitrogênio, comandado pelo sistema alternativo induzido pelo nitrato, mas continuaria atuando na inibição da resposta celular a estresse. Isso impediria a retomada do crescimento celular como observado no meio com nitrato contendo H_2O_2 e rapamicina (Fig. 10B). Com isso, é possível propor que a resposta de GDB 248 ao estresse induzido por H_2O_2 é mais dependente do funcionamento da via regulatória TOR do que de PKA, conectando diretamente a ativação do mecanismo de defesa celular a disponibilidade de nitrogênio do meio.

6 CONCLUSÕES

Devido a eficiência respiratória apontada em *D. bruxellensis* GDB 248 pela presença de três sítios de fosforilação em sua cadeia respiratória é importante que aspectos do metabolismo respiratório, gerador de estresse oxidativo, desta levedura sejam analisados em relação à própria capacidade respiratória. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem conhecimentos sobre a regulação e ativação do sistema de defesa antioxidante de *D. bruxellensis* GDB 248, bem como sua habilidade em resistir a presença de EROs. Primeiramente, nós observamos que *D. bruxellensis* GDB248 é mais sensível ao estresse oxidativo do que *S. cerevisiae* JP1, mesmo com o maior conteúdo de tióis citosólicos. A presença de galactose induz a expressão de genes da respiração e torna a levedura mais resistente ao H₂O₂. Esta resistência, depende, exclusivamente, do aumento da expressão do gene *GPX1* associado a capacidade que a célula tem em direcionar uma parcela significativa do conteúdo total de tióis livres para a produção de enzimas ricas em conteúdo de tióis. A presença do nitrato aumenta a sensibilidade da célula a presença do H₂O₂, devido a produção de EROs associada à sua assimilação na presença de oxigênio. Além disso, o nitrato provocou a regulação negativa na expressão do gene *YAP1* tornando a célula ainda mais sensível que em amônio. A resistência ao H₂O₂ não tem relação com o GSH. A adição exógena de GSH tornou a células mais sensível ao estresse, provavelmente por um mecanismo de resposta do bloqueio da mitofagia. Foi possível observar também que a resposta de GDB 248 ao estresse induzido por H₂O₂ depende da atividade das vias regulatórias TOR e PKA, sendo mais fortemente regulada aos sinais de funcionamento da via TOR. O nitrato apresenta grande poder nesta via, podendo ativar fortemente os genes NCR para o crescimento celular. Além disso, pode estar favorecendo a indução dos genes *YAP1* em resposta ao aumento da defesa antioxidante. A indução da resposta adaptativa e o efeito da restrição calórica não foram efetivas para contornar os danos causados pelo H₂O₂ em GDB 248. Esses resultados indicam que os sinais para ativação da defesa antioxidante não são tão efetivos em GDB 248 como se conhece em *S. cerevisiae*.

A partir desses resultados, estamos propondo um modelo de regulação metabólica para explicar a ativação do sistema de defesa antioxidante em *D. bruxellensis* (Fig. 11). Nesse modelo, o sistema de defesa antioxidante parece ser negativamente controlado pelas vias TORC1 e PKA que promovem o crescimento

celular. A força de repressão exercida pelas duas vias em conjunto impede que a levedura ative o mecanismo de defesa, mesmo que na presença de H_2O_2 . Quando a via PKA é inibida ou tem sua atividade diminuída pela presença de uma fonte exclusivamente respirável de carbono, ocorre uma liberação parcial desse sistema de defesa antioxidante constituído pelo mecanismo dependente de Sod-Gpx, seja diretamente pela inibição de PKA ou indiretamente pela desrepressão dos genes submetidos ao mecanismo GCR. Isto leva ao aumento da tolerância e diminuição do crescimento celular. Do outro lado, a inibição da via TOR também faz liberar parcialmente esse sistema de defesa, com aumento da tolerância e diminuição do crescimento celular. Isso é amplificado quando a célula está usando nitrato, justamente para ativação dos genes reprimidos pelo mecanismo NCR.

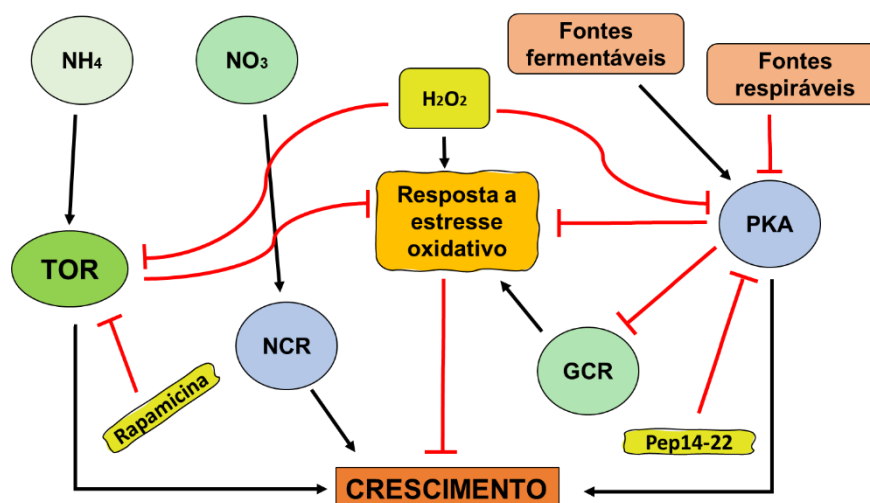


Figura 11. Modelo regulatório propositivo da resposta de *D. bruxellensis* GDB 248 ao tratamento com H_2O_2 e a relação dessa resposta com as vias de regulação do crescimento celular. GCR: mecanismo de repressão catabólica pela glicose; pep14-22: peptídeo 14-22 miristoilado inibidor da PKA; PKA: proteína quinase A; NCR: mecanismo de repressão catabólica pelo nitrogênio; TOR: quinase do mecanismo de *Tolerance To Rapamicin*. Os símbolos em preto indicam ativação metabólica. Os símbolos em vermelho indicam inibição metabólica.

Esse modelo ainda leva em consideração apenas aspectos globais de atuação das duas grandes vias regulatórias na levedura: PKA e TOR. Ainda não é possível apontar os mecanismos de regulação diretamente relacionados aos genes do sistema de defesa, pois mais estudos são necessários com a análise de expressão dos genes testados quando as células são tratadas com um dos inibidores na presença ou ausência de H_2O_2 em diferentes fontes de nitrogênio. No entanto, marca uma posição inicial para os estudos da regulação da resposta celular ao estresse oxidativo nesta levedura.

REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI, V., & CHINOPOULOS, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends in Pharmacological Sciences**, 27(12), 639–645. doi:10.1016/j.tips.2006.10.005
- ADITIYA, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H., 2016. **Second generation bioethanol production: A critical review**. *Renew. Sus. Energ. Rev.* 66, 631–653.
- AGUILAR-USCANGA MG, DELIA ML, STREHAIANO P (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Appl Microbiol Biotechnol** 61:157-162.
- AGNOLUCCI, M., Tirelli, A., Cocolin, L., & Toffanin, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: 7h27 Impact on wine and winemaking. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33, 180. 728. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>
- ALUGOJU, P.; PERIYASAMY, L.; DYAVIAIAH, M. (2020). Protective effect of quercetin in combination with caloric restriction against oxidative stress induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae* in cells. **Letters in Applied Microbiology**, 71(3):272-279. lam.13313–. doi:10.1111/lam.13313.
- ANDERSON, D. **Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage**. *Mutation Research, Amsterdam*, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ARAKI T., UESONO, Y., OGUCHI, T., TOH, E.A. (2005). LAS24/KOG1, a component of the TOR complex 1 (TORC1), is needed for resistance to local anesthetic tetracaine and normal distribution of actin cytoskeleton in yeast. **Genes Genet Syst** 2005, 80:325-343.
- ATIA, A. et al. A Review of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1); A Multifunctional Antioxidant Enzyme. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 4, 118-122, 2014.
- AVERY, A. M.; AVERY, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **Journal Biology Chemistry**. 276: 33730–33735.
- AVILA, J., C. GONZALEZ, N. BRITO, F. MACHIN, M. D. PEREZ, AND J. M. SIVERO. 2002. A second Zn(II)2Cys6 transcriptional factor encoded by the YNA2 gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. **Yeast** 19:537–544.
- BARRAZA CE, SOLARI CA, MARCOVICH I. (2017) The role of PKA in the translational response to heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185416>

BAYLIAK, M.; BURDYLIUK, N.; LUSHCHAK, V. (2017). Growth on Alpha-Ketoglutarate Increases Oxidative Stress Resistance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Microbiology**, 1–9. doi:10.1155/2017/5792192

BAUMBER J., BALL B.A., GRAVANCE C.G., MEDINA V. & DAVIES-MOREL M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.** 21:895-902.

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. AND YARROW, D. (1990) **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge University Press, Cambridge.

BRANCO, M. R., MARINHO, H. S., CYRNE, L., ANTUNES, F., Decrease of H₂O₂ (2004) Plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*., **Biol Chem.** Feb 20;279(8):6501-6.

BASSI, A. P. G.; MENEGUELLO, L.; PARALUPPI, A. L. et al. (2018) Interaction of *Saccharomyces cerevisiae*–*Lactobacillus fermentum*–*Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 11:1661–72.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. (2015). Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, p. 248-258.

BASSI, A.P.G., SILVA, J.C.G., REIS, V.R., AND CECCATO-ANTONINI, S.R., (2013). Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29, 1661-1676.

BASSO, R. F., ALCARDE, A. R., PORTUGAL, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Res Int.** 86:112–120.

BASÍLIO, A. C. M., DE ARAÚJO, P. R. L., DE MORAIS, J. O. F., DA SILVA FILHO, E. A., DE MORAIS, M. A., & SIMÕES, D. A. (2008). Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Current Microbiology**, 56(4), 322–326. doi:10.1007/s00284-007-9085-5.

BECKNER, M.; IVEY, M.L; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**. ISSN 0266-8254. 2011.

BENJAPHOKEE, S., HASEGAWA, D., YOKOTA, D., ASVARAK, T., AUESUKAREE, C., SUGIYAMA, M., KANEKO, Y., BOONCHIRD, C., HARASHIMA, S., 2012. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **N. Biotechnol.** 29 (3), 379–386.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.** 2013, 1830, 3289–3303.

BLEIER, L., WITTIG, I., HEIDE, H., STEGER, M., BRANDT, U., & DRÖSE, S. (2015). Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, 78, 1–10.

BOSIO, M.C.; FERMI, B.; SPAGNOLI, G.; LEVATI, E.; RUBBI, L.; FERRARI, R.; PELLEGRINI, M.; DIECI, G. Abf1 and Other General Regulatory Factors Control Ribosome Biogenesis Gene Expression in Budding Yeast. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, 4493–4506.

BLOMQVIST, J. *Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. Uppsala: **Swedish University of Agricultural Sciences**, 59p. 2011.

BLOMQVIST, J; NOGUE, V.S; GORWA-GRAUSLUND, M; PASSOTH, V. Physiological require-ments for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic con-ditions. **Yeast**. 29:265–274. 2012.

BOER, V. M.; TAI, S. L.; VURALHAN, Z.; ARIFIN, Y.; WALSH, M. C.; PIPER, M. D. W.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T.; DARAN, J. M. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. **FEMS yeast research**, v. 7, p. 604–20, 2007.

BOKULICH, N. A., & BAMFORTH, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 77(2), 157–172. doi:10.1128/mmmbr.00060-12

CAJUEIRO, D.B.B., PARENTE, D.C., LEITE, F.C.B., DE MORAIS, M.A. JR, DE BARROS PITA W. (2017) Glutamine: a major player in nitrogen catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek** 110: 1157-1168. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0888-5>

CAMERONI, ELISABETTA; HULO, NICOLAS; ROOSEN, JOHNNY; WINDERICKX, JORIS; VIRGILIO, CLAUDIO DE (2004). The Novel Yeast PAS Kinase Rim15 Orchestrates G0-Associated Antioxidant Defense Mechanisms. **Cell Cycle**, 3(4), 460–466. doi:10.4161/cc.3.4.791

CAMPOS, S. E.; AVELAR-RIVAS, J. A.; GARAY, E., JUÁREZ-REYES, A. DELUNA, A. (2018) Genomewide mechanisms of chronological longevity by dietary restriction in budding yeast. **Aging Cell** 17(3):e12749

CHATONNET P, DUBOURDIEU D, BOIDRON JN, PONS M (1992). The origin of ethylphenols in wines. **J Sci Food Agric** 60:165-17.

CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J. N., PONS, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. **J Sci Food Agric** 60:165-17

CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic bacteria on the ethylphenol content of red wines. **Am J Enol Vitic** 46:463-468.

CHATONNET, P., VIALA, C., DUBOURDIEU, D. (1997) Influence of poly-phenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. **Am J Enol Vitic** 48:443-448.

CONRAD, M.; KANKIPATI, H.N.; KIMPE, M.; VAN ZEEBROECK, G.; ZHANG, Z.; THEVELEIN, J.M. The Nutrient Transceptor/PKA Pathway Functions Independently of TOR and Responds to Leucine and Gcn2 in a TOR-Independent Manner. **FEMS Yeast Res.** 2017, 17, fox048

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.; MOSELE, S.H.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, H.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.; ECHEVERRIGARAY, S. (2008) Genetic conservation and medicinal properties of mate (*Ilex paraguariensis* St Hil). **Pharmacognosy Reviews**. v. 2, n.4, p. 326-338.

CARMEL-HAREL, O., & STORZ, G. (2000). Roles of the Glutathione- and Thioredoxin-Dependent Reduction Systems in the *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* Responses to Oxidative Stress. **Annual Review of Microbiology**, 54(1), 439–461. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.439.

CARNEY, J.M., STARKE-REED, P.E., OLIVER, C.N., LANDUM, R.W., CHENG, M.S., WU, J.F., FLOYD, R.A., 1991. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitrone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, 3633/3636

CARRASCOSA, J; VIGUERA, M. D; NÚÑEZ DE CASTRO, I; SCHEFFERS, W. Metabolism of acetaldehyde and custers effect in the yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 3, p. 209-215, 1981.

CARRILLO, J.D.; TENA, M. T. (2007). Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** 387, 2547-2558.

CHA, M. K., Choi, Y. S., Hong, S. K., Kim, W. C., No, K. T., & Kim, I. H. (2003). Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 278(27), 24636–24643.

CHATONNET, P., Dubourdie, D., Boidron, J., & Pons, M. (1992). **The origin of ethylphenols in wines**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165–178. doi:10.1002/jsfa.2740600205

CHATONNET, P., Dubourdien, D., Boidron, J. N. (1995). The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. 48: 463-468.

CHATONNET, P., Viala, C., Dubourdieu, D. (1997). Influence of Polyphenolic Components of Red Wines on the Microbial Synthesis of Volatile Phenols. **American Journal of Enology and Viticulture**. 48: 443-448.

COHEN, M. V. (1989). Free Radicals in Ischemic and Reperfusion Myocardial Injury: Is this the Time for Clinical Trials? **Annals of Internal Medicine**, 111(11), 918. doi:10.7326/0003-4819-111-11-918.

CONRAD M, Schothorst J, Kankipati HN, Zeebroeck GV, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM (2013) Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS. Microbiol. Rev.** 38:254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>.

CONTERNO, L., C. M. L. Joseph, T. J. Arvik, T. Henick-Kling, and L. F. Bisson. 2006. **Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines**. Am. J. Enol. Vitic. 57:139–147.

CORTÉS-DIÉGUEZ, S., Rodríguez-solana, R., Domínguez, J. M., Díaz, E. (2015). Impact odorants and sensory profile of young red wines from four Galician (NW of Spain) traditional cultivars. **J Inst Brew**.121:628–635.

COLLINSON L. P, DAWES I. W, Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress, **J Gen Microbiol**. 1992 Feb;138(2):329-335.

COUSO, I. et al. Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in *Chlamydomonas*. **Plant Cell Advance Publication. Published on**, 2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00179>

CRAUWELS, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., Lievens, B. (2015) *Brettanomyces Bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **Brew Sci** 68:110

CURTIN, C. D., BORNEMAN, A. R., CHAMBERS, P. J., & PRETORIUS, I. S. (2012). De-Novo Assembly and Analysis of the Heterozygous Triploid Genome of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. **PLOS ONE**, 7(3)e33840. doi:10.1371/journal.pone.0033840

CULOTTA, V. C., YANG, M., O'HALLORAN, T. V. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, V. 1763 , p. 747-758, 2006.

CODATO, C. B.; MARTINI, C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; BASTOS, R.G. (2018). Ethanol production from *Dekkera bruxellensis* in synthetic media with pentose. **brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, p. 10-16.

DAVIES, K.J. (1995) Oxidative stress: The paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Sym**, 61, 1–31.

DA SILVA, J. M., RIBEIRO, K. C., TELES, G. H., RIBEIRO, E., MORAIS JR, M. A. DE BARROS PITA, W. (2020). Fermentation profiles of the yeast *Brettanomyces bruxellensis* in d-xylose and l-arabinose aiming its application as a second-generation ethanol producer. **Yeast**. Nov; 37(11):597-608.

D'AUTRÉAUX, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 8(10), 813–824. doi:10.1038/nrm2256

DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**, 20(5), 567–574. doi:10.1016/s0740-0020(02)00152-1

DEMASI, A. P. D., Pereira, G. A. G., & Netto, L. E. S. (2006). Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. **FEBS Journal**, 273(4), 805–816. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05116.x.

DE BARROS PITA, W.; TELES, G. H.; PEÑA-MORENO, I. C.; DA SILVA, J. M.; DE MORAIS, M. A. (2019). The biotechnological potential of the yeast *Dekkera bruxellensis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Jun 24;35(7):103. doi: 10.1007/s11274-019-2678-x.

DE BARROS PITA, W., SILVA, D. C., SIMÕES, D. A., PASSOTH, V., & DE MORAIS, M. A. (2013a). Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. **Antonie van Leeuwenhoek**, 104(5), 855–868. doi:10.1007/s10482-013-9998-x

DE BARROS PITA, W., TIUKOVA, I., LEITE, F. C. B., PASSOTH, V., SIMÕES, D. A., & DE MORAIS, M. A (2013b). The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, 30(3), 111–117. doi:10.1002/yea.2945

DE BARROS PITA, W., LEITE, F. C. B., DE SOUZA LIBERAL, A. T., SIMÕES, D. A., & DE MORAIS, M. A. (2011). The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, 100(1), 99–107. doi:10.1007/s10482-011-9568-z

DE SOUZA LIBERAL AT, CARAZZOLLE MF, PEREIRA GA, ET AL. (2012). The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the *ARO10* gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. *World J Microbiol Biotechnol* 28(7): 2473– 2478.

DE SOUZA LIBERAL, A. T., BASÍLIO, A. C. M., DO MONTE RESENDE, A., BRASILEIRO, B. T. V., DA SILVA-FILHO, E. A., DE MORAIS, J. O. F., SIMÕES, M. A., DE MORAIS, M. A. (2007). Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 102(2). doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x

DELAUNAY, A.; PFLIEGER, D.; BARRAULT, M.B.; VINH, J.; TOLEDANO, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell**, 111, 471–481.

DELAUNAY, A. *et al.* The oxidative stress response mediated via POS9/Skn7 in regulated BY4741 the RAS/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetic and Genomics**, 261, 740-752, 2002.

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

DILOVA I, CHEN CY, POWERS T. (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. **Curr Biol** 12:389 – 395. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00677-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00677-2). 211.

DILOVA I, ARONOVA S, CHEN JCY, POWERS T. (2004). Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1p.Rtg3p-dependent target genes. **J Biol Chem** 279: 46527– 46535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409012200>.

ELEUTHERIO, E., BRASIL, A. DE A., FRANÇA, M. B., DE ALMEIDA, D. S. G., RONA, G. B., & MAGALHÃES, R. S. S. (2018). Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons. **Fungal Biology**, 122(6), 514–525. doi:10.1016/j.funbio.2017.12.003.

ELSZTEIN, C. **Identificação dos mecanismos moleculares de resistência ao polihexametileno biguanida na levedura *Saccharomyces cerevisiae***. (2011). Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ELSZTEIN, C., *et al.* (2016) NCW2, a Gene Involved in the Tolerance to Polyhexamethylene Biguanide (PHMB), May Help in the Organisation of β -1,3-Glucan Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. **Curr Microbiol** 73(3):341-345.

ELSZTEIN, C.; MENEZES, J.A.S.; MORAIS JR, M.A (2008). Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuelethanol fermentation process. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.9, p.967-973, 2008.doi:10.1007/s10295-008-0371-4. 17.

FINGERMAN, I.; NAGARAJ, V.; NORRIS, D.; VERSHON, A.K (2003). Sfp1 Plays a Key Role in Yeast Ribosome Biogenesis. **Eukaryot. Cell**, 2, 1061–1068.

FEDOSEEVA, E. B. (2017). The metathoracic spiracles in some ants and wasps (Hymenoptera: Formicidae; Vespidae). **Russian Entomological Journal** 26 (1):49.

FELIPE-RIBEIRO, L., COSME, F., NUNES, F.M (2018) Reducing the negative sensory impact of volatile phenols in red wine with diferente chitosans: effect of structure on efficiency. **Food Chem** 242:591–600

GAMERO, A., FERREIRA, V., PRETORIUS, I. S., & QUEROL, A. (2014). Wine, Beer and Cider: Unravelling the Aroma Profile. **Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism**, 261–297. doi:10.1007/978-3-642-55013-3_10

- GALAFASSI, S., CAPUSONI, C., MOKTADUZZAMAN, M., & COMPAGNO, C. (2013). Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 40(3-4), 297–303. doi:10.1007/s10295-012-1229-3.
- GODARD, P., URRESTARAZU, A., VISSERS, S., KONTOS, K., BONTEMPI, G., VAN HELDEN, J. & ANDRE, B. (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology** 27, 3065–86.
- GO, Y.; JONES, D.P. (2013). The Redox Proteome. **J. Biol. Chem**, 288, 26512–26520.
- GRANT, C. M., MACIVER, F. H., & DAWES, I. W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, 29(6), 511–515. doi:10.1007/bf02426954
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th edition ed. Clarendon, Oxford.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, 141, p. 312-322, 2006.
- HAMANAKA, R. B., & CHANDEL, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends in Biochemical Sciences**, 35(9), 505–513. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.002
- HASAN R, LEROY C, ISNARD A. D, LABARRE J, BOY-MARCOTTE E, TOLEDANO M. B., The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors., **Mol Microbiol**. 2002 Jul;45(1):233-41.
- HENSCHKE P, CURTIN C, GRBIN P (2007) Molecular characterization of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Microbiol Aust** 28:76–78.
- HERESZTYN, T., 1986a. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. **Arch. Microbiol.**, 146, 96-98.
- HERESZTYN, T., 1986b. Formation of substituted tetra hydropyrimidines by a species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. **Am. J. Enol. Vitic.** 37, 127-132
- HIPKIN, C.R. (1989) **Nitrate assimilation in yeast. In: Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation** (Wray, J.L. and Kinghorn, J.R., Eds.), pp. 51^68. Oxford Science Publications, Oxford.
- HOFFMAN, G. A., GARRISON, T. R., & DOHLMAN, H. G. (2002). Analysis of RGS Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**, 617–631. doi:10.1016/s0076-6879(02)44744-1

HOLMSTRÖM, K. M., & FINKEL, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 15(6), 411–421. doi:10.1038/nrm3801

HOLTON JB, WALTER JH, TYFIELD LA, GALACTOSEMIA. (2001). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly S, Valle D, Childs B, Kinzler KW. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill, 8: 1553–1583.

HUGHES HALLETT, J.E.; LUO, X.; CAPALDI, A.P. (2014). State Transitions in the TORC1 Signaling Pathway and Information Processing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 198, 773–786.

Hu J, Wei M, Mirzaei H, Madia F, Mirisola M, Amparo C, et al. TorSch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell*. 2014;13:457– 67. doi: 10.1111/accel.12202.

IWAI, K. NAGANUMA, A. KUGE, S. (2010). Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkyl hydroperoxides to induce disulfide Bond formation in the Cad1 transcription factor. **J Biol Chem**. 285 (14): 10597-10604.

IZAWA, S., IKEDA, K., OHDATE, T., & INOUE, Y. (2007). Msn2p/Msn4p-activation is essential for the recovery from freezing stress in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 352(3), 750–755. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.100

JAEKWON L., CHRISTIAN, G., GILLES, L., DANIEL, S., JE´ROME, G., JEAN L., AND MICHEL B. T. (1999). Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. Vol. 274, No. 23, **Issue of June 4**, pp. 16040–16046, 1999.

JANG, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., ... Lee, S. Y. (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stressdependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**, 117(5), 625–635.

JO, S.-H., Son, M.-K., Koh, H.-J., Lee, S.-M., Song, I.-H., Kim, Y.-O., ... Huhe, T.-L. (2001). Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense against Oxidative Damage by Mitochondrial NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16168–16176. doi:10.1074/jbc.m010120200.

KAYIKCI, ÖMUR; MAGWENE, PAUL M. (2018). Divergent Roles for cAMP–PKA Signaling in the Regulation of Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. **Genes|Genomes|Genetics**, 8(11), 3529–3538. doi:10.1534/g3.118.200413

KISTLER, M., SUMMER, K. H., ECKARDT, F. (1986) Isolation of glutathionedeficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat Res** 173: 117–120

KANKI T, FURUKAWA K, YAMASHITA S (2015) Mitophagy in yeast: molecular mechanisms and physiological role. **Biochim Biophys Acta** 1853:2756–2765

KEHRER, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, 149(1), 43–50. doi:10.1016/s0300-483x(00)00231-6.

KALYANARAMAN, B. **Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students**: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*, 1, p. 244-257, 2013.

KISTLER, M., SUMMER, K.H. AND ECKARDT, F. (1986) Isolation of glutathione-dependent mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.** 173, 117–120.

KNORRE, D. A., SOKOLOV, S. S., ZYRINA, A. N., SEVERIN, F. F. (2016) How do yeast sense mitochondrial dysfunction? **Microbial Cell** 3:532–539.

KOWALCZYK, M. et al. Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of Omic' TechnologieV. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R; VIGNOLO. G.M. (eds) **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, 2nd Ed. West Sussex: Wiley-Blackwell. p 1 ± 24. 2016.

KOJER, K., BIEN, M., GANGEL, H., MORGAN, B., DICK, T. P., & RIEMER, J. (2012). Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. **The EMBO Journal**, 31(14), 3169–3182. doi:10.1038/emboj.2012.165.

KOROVILA, I.; HUGO, M.; CASTRO, J.P.; WEBER, D.; HÖHN, A.; GRUNE, T.; JUNG, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. **Redox Biol**, 13, 550–567
KRUMBHOLZ, G.; TAUSCHANOFF, W. *Mycotorula intermedia* n. sp., ein Beitrag zur Kenntnis der Gärungserreger im Wein. **Zentralbl Bakteriol.** 88:366–373, 1933.

KURTZMAN, C., FELL, J., & BOEKHOUT, T. (2011). The yeasts: A taxonomic study. Amsterdam: **Elsevier**. ISBN 978-0-444-52149. 2011.

KUGE, S. *et al.* Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **The EMBO Journal**, 7, 1710–1720, 1997.

KUMAR, C.; IGBARIA, A.; D'AUTREAU, B.; PLANSON, A.G.; JUNOT, C.; GODAT, E.; BACHHAWAT, A.K.; DELAUNAY-MOISAN, A.; TOLEDANO, M.B. Glutathione revisited: A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. **EMBO J.** 2011, 30, 2044–2056.

LAÉTITIA, G.; PASCAL, D.; YANN, D. The citrate metabolism in homo- and heterofermentative LAB: a selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. **Food and Nutr Sci.** 5: 953 ± 969. 2014.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v. 145, p. 2577-2585, 1999.

LEE, D., HWANG, W., ARTAN, M., JEONG, D.E., LEE, S.J. Effects of nutritional components on aging. (2015). **Aging Cell**;14:8–16. doi: 10.1111/ace.12277. 12.

LE MOAN, N.; CLEMENT, G.; LE MAOUT, S. The *Saccharomyces cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols: Contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. **J. Biol. Chem.** 2006, 281, 10420–10430.

LEONOV, A., et al. (2017) Specific changes in mitochondrial lipidome alter mitochondrial proteome and increase the geroprotective efficiency of lithocholic acid in chronologically aging yeast. **Oncotarget** 8(19):30672-30691

LONGO, V. D.; SHADEL, G. S.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B (2012). Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Metab**, 16 (1), 18-31.

LONGO, V. D., GRALLA, E. B., & VALENTINE, J. S. (1996). Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 271(21), 12275–12280. doi:10.1074/jbc.271.21.12275

LIN, X. (2002). The Copper Transporter CTR1 Regulates Cisplatin Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Pharmacology**, 62(5), 1154–1159. doi:10.1124/mol.62.5.1154

LI, Y., DING, H.Y., WANG, X.C., LIU, G.W., LI, X.W. An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. **Journal of animal physiology and animal nutrition** 100(5), 844-85. 2016.

LIMA, L.F.L.; RÉCO, A.S.; PEÑA, R.; GANGA, M.A.; CECCATO-ANTONINI, S. R. (2018). Volatile phenols are produced by strains of *Dekkera bruxellensis* under Brazilian fuel ethanol industry-like conditions. **FEMS Microbiology Letters**, p. 1-11.

LEITE, F. C. B, BASSO, T. O., DE BARROS PITA, W., GOMBERT, A. K., SIMÕES, D. A, DE MORAIS JR, MA (2013). Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Res** 13: 34–43.

LEITE, F. C. et. al. (2016). High intracellular trehalase activity prevents the storage of trehalose in the yeast. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, p. 210-214.

LEANDRO, M. J. et al. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygo saccharomyces rouxii* employs two plasma membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. **Microbiology**; 157:601–8.2011.

LEVIND.E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev.** Jun; 69(2);262-9. 2005.

LIBERAL, A.T. et al. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.538 –547,2007.

LIMA, A., OLIVEIRA, C., SANTOS, C., CAMPOS, F.M., COUTO, J.A. 2018. Phenolic composition of monovarietal red wines regarding volatile phenols and its precursors. **European Food Research and Technology**. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3110-8>.

LIMAU. Biotecnologia industrial. **Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 1, SP, Editora Blucher LTDA, 2001.

LIMTONGS.*et.al*. Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. **Kasetsart J (Natural Sci)**; 34:64–73.2000.

LIMTONGS.*et.al*. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technol** ;98:3367–74.2007.

LIN, S. J., DEFOSSEZ, PA., GUARENTE, L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science** 289(5487):2126-8

LUCENAB.T. *et al*. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiol**; 10:298.2010.

LUCENA, B.T. *et.al*. Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. **Journal of Bacteriology** (Print), v.194, p.3018 – 3018, 2012.

LUCENA, R.M. *et.al*. Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. **Journal of Applied Microbiology**.113: 629-640, 2012.

LUCENA, R. M. *et. al*. Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. **Antonie van Leeuwenhoek** 108:1147,2015.

LOEWITH, R.; JACINTO, E.; WULLSCHLEGER, S.; LORBERG A.; JOSÉ L. CRESPO; BONENFANT, D.; PPLIGER, W.; JENOE, P.; HALL, M. N. (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, **Have Distinct Roles in Cell Growth Control**, 10(3), 0–468. doi:10.1016/s1097-2765(02)00636-6

LUDOVICOP, BURHAN SWC. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. **FEMS Yeast Res.** 14(1):33–39.2014.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene** v. 290, p. 1–18, 2002.

MAGASANIK, B. Ammonia Assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, 2, pp. 827–829, 2003.

MARÍ, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCÍA-RUIZ, C., KAPLOWITZ, N., & FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. (2013). Mitochondrial glutathione: Features, regulation and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1830(5), 3317–3328. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.018.

MARZLUF, G.A. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n.1, p. 17–32, 1997.

MCKERNAN, T. B., WOODS, E. B., & LASH, L. H. (1991). Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 288(2), 653–663. doi:10.1016/0003-9861(91)90248-h

MEISTER, A., & ANDERSON, M. E. (1983). Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, 52(1), 711–760. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431

MENG, D., ZHANG, P., LI, S., HO, C., ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 36–44, 2017.

MIRZAEI H, SUAREZ JA, LONGO VD. (2014) Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. **Trends Endocrinol Metab**; 25:558–66. doi: 10.1016/j.tem.2014.07.002.

MITCHELL AP, MAGASANIK B. (1983). Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 258: 119 –124. 25.

MIYAGI, H., KAWAI, S., & MURATA, K. (2009). Two Sources of Mitochondrial NADPH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 284(12), 7553–7560. doi:10.1074/jbc.m804100200

MOHD AZHAR, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). **Yeasts in sustainable bioethanol production: A review**. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. doi:10.1016/j.bbrep.2017.03.003

MORANO, K. A., GRANT, C. M., & MOYE-ROWLEY, W. S. (2011). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 190(4), 1157–1195. doi:10.1534/genetics.111.128033

MOKTADUZZAMAN M, GALAFASSI S, CAPUSONI C, VIGENTINI I, LING Z, PISKUR J, COMPAGNO C. (2015). Galactose utilization sheds new light on sugar metabolism in the sequenced strain *Dekkera bruxellensis* CBS 2499. **FEMS Yeast Res**, 15(2):fou009–9. doi: 10.1093/femsyr/fou009

OELOFSE, A., PRETORIUS, I. S.; DU TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. **South African Journal of Enology & Viticulture**, 29(2). doi:10.21548/29-2-1445, 2008.

OHKAWA H, OHISHI N AND YAGI K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95: 351-358.

OSTERGAARD S, OLSSON L, JOHNSTON M, NIELSEN J (2000) Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the GAL gene regulatory network. *Nat Biotechnol* 18:1283-6. DOI: 10.1038/82400

OUTTEN, C. E., E CULOTTA, V. C. (2004). Alternative Start Sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 Gene Are Responsible for Mitochondrial and Cytosolic Isoforms of Glutathione Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, 279(9), 7785–7791. doi:10.1074/jbc.m312421200

OZGUR, E. et al. The effects of N-acetylcysteine and epigallocatechin-3-gallate on liver tissue protein oxidation and antioxidant enzyme levels after the exposure to radiofrequency radiation. **International Journal of radioation biology**, v. 91, n. 2, p. 187-193, 2015.

PAN, X.; ZHOU, G.; WU, J.; BIAN, G.; LU, P.; RAIKHEL, A. S.; XI, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(1), E23–E31. doi:10.1073/pnas.1116932108

PAN, Y., SCHROEDER, E. A., OCAMPO, A., BARRIENTOS, A., SHADEL, G. S.: Regulation of yeast chronological lifespan by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS (2011). **Signaling. Cell Metab**; 13:668–678.

PARENTE, D.C., CAJUEIRO, D.B.B., MORENO, I.C.P., LEITE, F.C.B., DE BARROS PITA W., DE MORAIS, M.A. JR (2017) On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. **Yeast**. <https://doi.org/10.1002/yea.3290>

PARENTE, D. C., Vidal, E. E., Leite, F. C. B., Pita, W. B., de Moraes Jr, M. A. (2015). Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. **Yeast**, 32(1):77–87.

PARK, S. G., CHA, M. K., JEONG, W., & KIM, I. H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 275(8), 5723–5732

PASSOTH, V; BLOMQVIST, J; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microbiol**. 73:4354–4356. 2007

PEDROSO N, MATIAS A. C, CYRNE L, ANTUNES F, BORGES C, MALHÓ R, DE ALMEIDA R. F, HERRERO E, MARINHO H. S., Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*., **Free Radic Biol Med**. 2009 Jan 15;46(2):289-98.

PEREIRA, L. F., BASSI, A. P., AVANSINI, S. H., NETO, A. G., BRASILEIRO, B. T., CECCATO-ANTONINI, S. R., DE MORAIS, M. A. JR. (2012) The physiological

characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek** 101: 529-539. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9662-2>

PEREIRA, V.J., FERNANDES, D., CARVALHO, G., BENOLIEL, M.J., SAN ROMÃO, M.V., BARRETO CRESPO, M.T. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. **Elsevier**, 44, 4850-4859.

PICAZO, C.; MOLIN, M. Impact of Hydrogen Peroxide on Protein Synthesis in Yeast. **Antioxidants**. 2021, 10, 952. <https://doi.org/10.3390/antiox10060952>.

PINTO, L., BARUZZI, F., COCOLIN, L., AND MALFEITO-FERREIRA, M. Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. In wine: recent advances and future trends. **Trends Food Sc. Technol.** 99, 88–100, 2020. doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.013.

PISKUR, J. et al. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **Int J Food Microbiol.** Jul 2;157(2):202-9, 2012.

PROCHÁZKA, E., POLÁKOVÁ, S., PIŠKUR, J., & SULO, P. (2010). Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. **FEMS Yeast Research**, no–no. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00644.x

PENNINCKX, M.J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Res.** 2002, 2, 295–305

PLANK, M. Interaction of TOR and PKA Signaling in *S. cerevisiae*. **Biomolecules** 2022, 12, 210. <https://doi.org/10.3390/biom12020210>

PRONK, J. T., Y DE STEENSMA, H., & VAN DIJKEN, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 12 (16), 1607–1633. doi:10.1002/(sici)1097-0061(199612)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4

PEÑA-MORENO, I. C., CASTRO PARENTE, D., DA SILVA, J. M., ANDRADE MENDONÇA, A., ROJAS, L. A. V., DE MORAIS JUNIOR, M. A., & DE BARROS PITA, W. (2018). Nitrate boosts anaerobic ethanol production in an acetate-dependent manner in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. doi:10.1007/s10295-018-2118-1.

PEÑA-MORENO, I.C., CASTRO PARENTE, D., DA SILVA, J.M., ANDRADE MENDONÇA, A., ROJAS LAV, DE MORAIS JR MA, DE BARROS PW (2019) Nitrate boosts anaerobic ethanol production in an acetate-dependent manner in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 46:209–220. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2118-1>

PEÑA-MORENO, I. C. **Regulação do metabolismo de nitrato na levedura industrial *Dekkera bruxellensis***. (2020) Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. (Tese de Doutorado), p. 48-52.

PEÑA-MORENO, I. C.; PARENTE, D. C.; DA SILVA, K. M.; ELTON PEDRO NUNES PENA; FABIANA APARECIDA CAVALCANTE SILVA; TERCILIO C. JR.; DE BARROS PITA, W.; MORAIS JR, M.A.; (2021). *Comparative proteomic analyses reveal the metabolic aspects and biotechnological potential of nitrate assimilation in the yeast Dekkera bruxellensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, doi:10.1007/s00253-021-11117-0

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468, 1989.

QIU, Z., JIANG, R. (2017). **Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7**. *Biotechnol. Biofuels* 10 (1), 125.

REMYINGTON, S. J. (2011). Green fluorescent protein: A perspective. **Protein Science**, 20(9), 1509–1519. doi:10.1002/pro.684

ROZPEĐOWSKA, E., HELLBORG, L., ISHCHUK, O. P., ORHAN, F., GALAFASSI, S., MERICO, A., PIŠKUR, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, 2(1). doi:10.1038/ncomms1305.

RHEE, S. G., CHAE, H. Z., & KIM, K. (2005). Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, 38(12), 1543–1552.

RÖDE, C. KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. (2007). Species-specific identification of *Dekkera* / *Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S Rrna, **Fems Yeast Research**, 7(6), 1013–1026. Doi:10.1111/j.15671364.2007.00267.x

ROACH, M. J., & BORNEMAN, A. R. (2020). New genome assemblies reveal patterns of domestication and adaptation across *Brettanomyces* (*Dekkera*) species. **BMC Genomics**, 21(1). doi:10.1186/s12864-020-6595-z

RODKAER, S.V., FAERGEMAN, N.J. (2014). Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res** 14:683–696. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12157>.

SADEH, A.; MOVSHOVICH, N.; VOLOKH, M.; GHEBER, L.; AHARONI, A. (2011). Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. **Molecular Biology of the Cell**, 22(17), 3127–3138. doi:10.1091/mbc. E10-12-1007

SAMUNI Y, GOLDSTEIN S, DEAN OM, BERK M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta**. Aug;1830(8):4117-29.
SLATTERY, M.G.; HEIDEMAN, W. Coordinated Regulation of Growth Genes in *Saccharomyces cerevisiae* (2007). **Cell Cycle**, 6, 1210–1219.

SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUK, O. P.; & PIŠKUR, J. (2014) The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323–332.

SHOSHAN-BARMATZ, V., DE PINTO, V., ZWECKSTETTER, M., RAVIV, Z., KEINAN, N., & ARBEL, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. **Molecular Aspects of Medicine**, 31(3), 227–285. doi:10.1016/j.mam.2010.03.002.

SHANTHA KUMARA, H. M. C., DE CORT, S. & VERACHTERT, H. (1993) Localization and characterization of α -glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 2352–2358.

SILVA, R. B. O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação**. 1992. 154p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Paulista, Rio Claro.

SIVIERIO, J. M (2002) Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS. Microbiol. Rev.** 3:277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x>.

SOUZA, R. B.; SANTOS, B. M.; FÁTIMA R. S., RAQUEL; S., PAULA K. N.; LUCENA, B.T.; MORAIS, M. A. (2012). The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.39, p.1645 - 1650.

Liberal, S., Theresa, A.; Falsarella, C. M.; Amarante, P. G.S.; Ardaillon, D.; Morais Jr, M. A. (2012). The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.2473 – 2478.

SPITAEELS, F., WIEME, A. D., JANSSENS, M., AERTS, M., VAN LANDSCHOOT, A., DE VUYST, L., & VANDAMME, P. (2015). The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. **Food Microbiology**, 49, 23–32. doi:10.1016/j.fm.2015.01.008

SPONHOLZ, W. R. (1993) Wine spoilage by microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), pp. 395–420. **Harwood Academic Publishers**, Postrasse, Switzerland.

STEENSELS, J., DAENEN, L., MALCORPS, P., DERDELINCKX, G., VERACHTERT, H., & VERSTREPEN, K. J. **Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations**. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005, 2015.

STEPHEN, D. W. S., & Jamieson, D. J. (1996). Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, 141(2-3), 207–212. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08386.x

TACHIBANA, T. *et al.* Major Peroxiredoxin-induced activation of YAP1 transcription factor is mediated BY4741 reduction-sensitive disulfide Bonds and reaveal a Low Level of transcription activation. **Journal of Biology Chemistry**, 284, 4464-4472, 2009.

TEMPLE, M. D., *et al.* Complex cellular responses to reactive oxygem spicies (Review). **Trends Cell Biol.**, 15, p. 319 – 225, 2005.

TOLEDANO, M. B., DELAUNAY-MOISAN, A., OUTTEN, C. E., & IGBARIA, A. (2013). Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast. **Antioxidants & Redox Signaling**, 18(13), 1699–1711. doi:10.1089/ars.2012.5033.

TOLEDANO, M.B.; KUMAR, C.; LE MOAN, N.; SPECTOR, D.; TACNET, F. The system biology of thiol redox system in Escherichia coli and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. **FEBS Lett.** 2007, 581, 3598–3607.

TOLEDANO M. B, DELAUNAY A, BITEAU B, SPECTOR D, AZEVEDO D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. in Topics in Current Genetics, **Springer-Verlag**. 241-303.

TOPF, U.; USZCZYNSKA-RATAJCZAK, B.; CHACINSKA, A. (2019). Mitochondrial stress-dependent regulation of cellular protein synthesis. **J. Cell Sci.**, 132, jcs226258

TIUKOVA IA, DE BARROS PITA W, SUNDELL D, HADDAD MOMENI M, HORN SJ, STÅHLBERG J, DE MORAIS MA JR, PASSOTH V (2014). Adaptation of Dekkera bruxellensis to lignocellulose-based substrate. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 61: 51-57.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. **Int J Biochem Cell Biol.**, 1, p. 39, 2007.

VALKO, M., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, 160, p. 1-40, 2006.

VAN DER WALT, J. Dekkera, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964.

VERACHTERT H (1992) Lambic and gueuze brewing: mixed cultures in action. **Microb Contam (COMETT)** 7:243–262

WONG, C. M., Siu, K. L., & Jin, D. Y. (2004). Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. **Journal of Biological Chemistry**, 279(22), 23207–23213.

WOOLFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; PISKUR, J.; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-33, 2007.

YAHARA, G. A; JAVIER, M. A; TULIO, M. J. M; JAVIER, G. R; GUADALUPE, A. U. M. Model-ing of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. **Bioprocess and biosystems engineering**. v. 30, n. 6, p. 389 -395, 2007.

YERLIKAYA S, MEUSBURGER M, KUMARI R, HUBER A, ANRATHER D, COSTANZO M, BOONE C, AMMERER G, BARANOV PV, LOEWITH R. (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology Cell**, v.27, n.2, p. 397-409.

ZHANG, W., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2018). Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 82(1), e00040–17. doi:10.1128/mnbr.00040-17

7 SÚMULA CURRICULAR

TRABALHOS DESENVOLVIDOS EM AUTORIA

XAVIER, R. M., SANTOS, M. M. S., QUEIROZ, M. G., DE LIMA SILVA, M. S., DE MORAIS JR, M. A. Lawsone, a 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone from *Lawsonia inermis* (henna), produces mitochondrial dysfunctions and triggers mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology Reports. Vol. 47, n. 2, p: 1173-1185, 2019. Doi: 10.1007/s11033-019-05218-3. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05218-3>;

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Trabalho apresentado no XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021, Petrolina-PE. Título: “Bloqueio da Ald3p como mecanismo chave para aumento dos rendimentos em etanol na levedura *Dekkera bruxellensis*.” Trabalho realizado por membros do Núcleo de Engenharia Metabólica orientado pelo profº Dr. Marcos Antonio de Morias Junior. Autores: TELES, G.H; XAVIER, M. R.; SILVA, PENA-MORENO, I.C; DE SOUZA BARROS, R; DE BARROS PITA; MORAIS JUNIOR

PALESTRAS E MINICURSOS

Minicurso apresentado na VIII Jornada de Pós-graduação em Genética realizada nos dias 20 a 24 de agosto de 2018, com carga horária total de 8 hora, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Título: “Fermentação alcoólica: interface Genética e Indústria. ”

Minicurso apresentado no primeiro curso de Inverno em Biociências realizado nos dias 25 de julho de 2018, com carga horária total de 15h, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Título: “Fermentação Industrial: aspectos da produção de etanol combustível e bebidas alcoólicas”.