UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

GRACIELE ALMEIDA DE OLIVEIRA

Restrição Calórica e Mitocôndrias: Papel no
Envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
23/09/2010

GRACIELE ALMEIDA DE OLIVEIRA

**Restrição Calórica e Mitocôndrias: Papel no
Envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof^a. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48r Oliveira, Graciele Almeida de
Restrição calórica e mitocôndrias: papel no envelhecimento de
Saccharomyces cerevisiae / Graciele Almeida de Oliveira. --
São Paulo, 2010.
116p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Kowaltowski, Alicia Juliana

1. Mitocôndria : Citologia 2. Envelhecimento animal I. T. II.
Kowaltowski, Alicia Juliana, orientador.

574.87342 CDD

Graciele Almeida de Oliveira
Restrição Calórica e Mitocôndrias: Papel no Envelhecimento de
Saccharomyces cerevisiae

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura:

Para meu Pai, Carlos Rodrigues de
Oliveira, *in memoriam*, minha Mãe,
Maria de Fatima Almeida Oliveira e
Irmão, Jefferson Almeida de Oliveira
com todo o meu amor

Agradecimentos

À professora Alicia J. Kowaltowski, por me apresentar o fantástico mundo da ciência através do caminho das mitocôndrias. Muito obrigada pela orientação, presteza, paciência e atenção. Pela imensa contribuição a minha formação acadêmica, profissional e humana.

Ao professor Mário H. Barros pela colaboração no projeto e ajuda com a construção de hiperexpressores e aos amigos que fiz em seu laboratório professor Ribamar, Cleverson Busso, Mariana, Viviane, Norton e Tadeu.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Herberty Facundo, Maynara Fornazari, João Victor, Fabiana, Bruno Chausse e à científica trindade, que algumas pessoas acreditam ser uma pessoa só: Bruno Queliconi, Ariel Cardoso e Erich Tahara. Ao último, agradecimentos especiais pela amizade, apoio, discussões sobre *S. cerevisiae* e ajuda nos trabalhos.

Ao Edson e Camille Caldeira pelo apoio técnico e pelo equilíbrio do laboratório e a Fernanda Cerqueira pelo “desequilíbrio” que leva a todos a momentos de descontração. A Fernanda Cunha pelas ponderações sempre elegantes de quem vê as coisas através de outras lentes (nossa fotógrafa).

Aos professores Luis E. S. Netto e Andreas K. Gomber pela colaboração nos trabalhos.

Ao professor Robert Ivan Schumacher pela ajuda nas medidas de citometria de fluxo.

Ao Professor Francis Sluse, por me acolher em seu laboratório na *Université de Liège* aos seus alunos Greg, Allan e Severine por me fazer sentir acolhida. Muito obrigado pelo aprendizado e as tardes de discussão sobre ciência. *Je vous remercie.*

Ao professor Roger Castilho pelas críticas e sugestões aos trabalhos.

Aos professores Etelvino Bechara e Nadja Lardner pelas discussões sobre ciência e assuntos relacionados a esse projeto.

Aos professores da graduação e da pós-graduação que tanto contribuíram para a minha formação e carreira científica.

À Universidade de São Paulo por todo apoio que dá a seu aluno, acolhendo-o e aos funcionários que tornam isso possível.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que fazem com que tudo funcione muito bem.

Aos meus pais Carlos Rodrigues de Oliveira e Maria de Fatima Almeida Oliveira e meu irmão Jefferson Almeida de Oliveira, os responsáveis pela minha alegria de ver as coisas, mesmo diante das adversidades e que sempre e incondicionalmente me apoiaram e motivaram. A minha nova irmã Ligia Oliveira e Amanda pela alegria de todo os dias e pelos assuntos não científicos.

Ao digníssimo Leonardo Sioufi dos Santos pelo apoio, companheirismo e paciência nos meus momentos bioquímicos.

Aos meus tios J. Elias de Almeida e Maria Ferreira pela motivação em seguir a ciência e a minha tia Célia Almeida pela desmotivação, apesar de sempre me ajudar, me levando ter certeza na decisão de que caminho seguir. A família Saraiva e Almeida por me acompanhar durante toda a minha trajetória.

Aos meus amigos Delma Pilão, Patricia Araújo (Ruivinha), Carolina Romagna, Paulo Silva, Lilian Taniguchi, Lidia Lima, Douglas Cancherine, Adriano Sartori, Silvia de Andrade, Antônio Inocência por me manter no limite da normalidade.

Às agências de fomento a pesquisa: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio a este projeto de doutoramento (05/50054-3), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à *John Simon Guggenheim Memorial Foundation*.

Resumo

Oliveira, G. A. **Restrição Calórica e Mitocôndrias: Papel no Envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 116p Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A restrição calórica (RC) é uma intervenção dietética capaz de estender a longevidade de vários organismos. O modelo para RC em *Saccharomyces cerevisiae* consiste da diminuição da concentração de glicose no meio de cultura e mostra um aumento tanto do tempo de vida cronológico quanto replicativo. Nosso objetivo foi investigar experimentalmente a ação da RC, focando principalmente nas causas e consequências das modificações de geração de EROs mitocondriais e como estas estão associadas ao processo de envelhecimento. Em um primeiro período de estudos, verificamos quais as fontes mitocondriais de EROs, e comprovamos que uma quantidade significativa se origina de proteínas da matriz mitocondrial, e não da cadeia de transporte de elétrons. Nós estudamos a participação de glicose e de outras fontes de carbono sobre o tempo de vida cronológico em leveduras e mostramos que o aumento da longevidade promovida pela RC está associado à uma mudança de metabolismo fermentativo para respiratório, com participação da via de sinalização de glicose. No estágio realizado no laboratório do Professor Francis Sluse na *Université de Liège*, Bélgica, estudamos a ação da RC em leveduras focando nas consequências das modificações no proteoma mitocondrial. Em nosso estudo proteômico, encontramos grandes modificações em proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos. Monitoramos a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e o tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae* e as mutantes nulas *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* e *gdh3Δ*, que codificam a aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada citosólica, NADP glutamato desidrogenase citosólica, a NAD glutamato desidrogenase mitocondrial, e a NADP glutamato desidrogenase mitocondrial, respectivamente. A atividade da NAD glutamato desidrogenase é aumentada em RC, mas a de NADP glutamato desidrogenase decresce em células controle. Aumentos do tempo de vida cronológico foram observados nas mutantes *bat2Δ* e *gdh1Δ* devido a RC, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada nas mutantes nulas para Gdh2p e Gdh3p em fase estacionária, indicando que essas proteínas são essenciais para os efeitos benéficos da RC. Nessas células WT crescidas em condições normais e as mutantes nulas apresentam iguais longevidades. Juntos, nossos resultados indicam que o aumento da longevidade em *S. cerevisiae* promovida pela RC depende da interação entre o sinal de glicose e o metabolismo de aminoácidos.

Palavras-chave: Restrição calórica, longevidade, proteoma mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, diidrolipoil desidrogenase, metabolismo de aminoácidos.

Abstract

Oliveira, G.A. **Caloric Restriction and Mitochondria: Role in *Saccharomyces cerevisiae* aging**. 2010. 116p PhD Thesis – Graduate Program in Sciences (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Calorie restriction (CR) is a dietary intervention capable of extending lifespans in a wide range of organisms. A yeast model of CR has been developed in which limiting the concentration of glucose in growth media of *Saccharomyces cerevisiae* leads to enhanced chronological and replicative life spans. Our aim was to experimentally investigate the effects of CR, focusing mainly on the causes and consequences of changes in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and how these are associated with the aging process. Initially, we looked for sources of mitochondrial ROS, and found that a significant amount of ROS comes from mitochondrial matrix enzymes and not from the electron transport chain. We studied the participation of glucose and other carbon sources in chronological lifespan and show that increased longevity promoted by CR is associated with a metabolism change from fermentation to respiration, with participation of glucose repression pathway. During studies performed in the laboratory of Professor Francis Sluse at the *Université de Liège*, Belgium, we studied the effect of CR in yeast with focus on the consequences of changes in the mitochondrial proteome. We found large proteomic changes in proteins involved in amino acid metabolism. We monitored the activity of enzymes related to amino acid metabolism and chronological life span of *S. cerevisiae* null mutants *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ*, and *gdh3Δ*, which encode for the cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase, cytosolic NADP glutamate dehydrogenase, mitochondrial NAD glutamate dehydrogenase and mitochondrial NADP glutamate dehydrogenase, respectively. The activity of NAD glutamate dehydrogenase is increased in CR, but NADP glutamate dehydrogenase decreases in control cells. Increases in chronological life span due to RC were observed in *bat2Δ* and *gdh1Δ* mutants, but no significant difference was found in Gdh2p and Gdh3p null mutants in the stationary phase, indicating that these proteins are essential for the beneficial effects of CR. In rich medium, WT cells and null mutants have similar life spans. Together, our results indicate that longevity enhancement by CR in *S. cerevisiae* depends on the interaction between glucose signals and amino acid metabolism.

Keywords: Caloric restriction, longevity, mitochondrial proteome, reactive oxygen species, dihydrolipoil dehydrogenase, amino acid metabolism.

Résumé

Oliveira, G.A. **Restriction Calorique et Mitochondrie: rôle dans le vieillissement de *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 116p Thèse de Doctorat - Programme d'études supérieures en sciences (Biochimie). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

La restriction calorique (RC) est une intervention diététique capable de prolonger la durée de vie dans divers organismes. Un modèle de RC pour la levure a été développé dans lequel limiter la concentration de glucose dans le milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae* a montré une augmentation de vieillissement chronologique et répliative. Notre objectif était d'étudier expérimentalement l'effet de la RC, en se concentrant principalement sur les causes et les conséquences des changements dans la production des espèces d'oxygène réactives (ROS) mitochondriales et de la façon dont elles sont associées au processus de vieillissement. Dans une première période d'études, qui a trouvé la source de ROS mitochondriale, nous montrons qu'une quantité importante vient d'enzymes de la matrice et pas de la chaîne de transport d'électrons. Nous avons étudié la participation de glucose et d'autres sources de carbone sur le vieillissement chronologique dans la levure et nous avons montré que l'augmentation de la longévité promue par RC est associée à un changement du métabolisme fermentaire à respiratoire, avec la participation de la voie de signalisation du glucose. Dans le laboratoire du professeur Francis Sluse à l'Université de Liège, en Belgique, nous avons étudié l'effet du RC dans la levure en se concentrant sur les conséquences des changements du protéome mitochondrial. Dans notre étude, nous avons constaté de grands changements des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés. Nous avons surveillé l'activité des enzymes liées au métabolisme des acides aminés et le vieillissement chronologique de *S. cerevisiae* et des mutants nuls *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* et *gdh3Δ*, qui codent aminotransférase pour les acides aminés à chaîne ramifiée cytosolique, NADP glutamate déshydrogénase cytotogique, NAD glutamate déshydrogénase mitochondriale et NADP glutamate déshydrogénase mitochondriale, respectivement. L'activité de la NAD glutamate déshydrogénase est accrue chez les RC et celle de la NADP glutamate déshydrogénase est baissée dans les cellules WT. Augmentations de vieillissement chronologique ont été observées en mutant *bat2Δ* et *Δgdh1* en raison de RC, mais aucune différence significative a été observée chez les mutants nuls pour Gdh3p et Gdh2p en phase stationnaire, ce qui suggère que ces protéines sont essentielles pour les effets bénéfiques de la RC. Les cellules WT et mutants nuls cultivées dans des conditions normales ont une durée de vie similaire. Ensemble, nos résultats indiquent que la longévité de *S. cerevisiae* parrainé par RC dépend de l'interaction entre le signal de glucose et le métabolisme des acides aminés.

Mots-clés: restriction calorique, la longévité, du protéome mitochondrial, les espèces d'oxygène réactives, dihydrolipoil déshydrogénase, métabolisme des acides aminés.

Abreviaturas e Siglas

2D-DIGE	Eletroforese em gel diferencial bidimensional
ADP	Difosfato de adenosina
ASB	Amidosulfobetaine-14, 3-[N,N-Dimethyl(3-myristoylamino)propyl]ammonio]propanesulfonate
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
BVA	análise de variancia biológica
Calcéina-AM	Calcein acetoxymethyl ester
Cat	Catalase
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre zinco
Cy2	Bue FAM
Cy3	TAMRA
Cy5	Alexa Fluor
CyDye	Carbocyanine dyes
DIA	Análise de gel diferencial (Differential In-gel analysis)
DTT	1,4-Dimercapto-2,3-butanediol (ditiotreitól)
EDTA	(Ethylenedinitrilo)tetraacetic acid disodium salt
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
Ercs	Círculos de rDNA extracromossomais (extrachromosomal rDNA circles)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FMN	Mononucleotídeo de flavina
fELA	Esclerose lateral amiotrófica familiar
FeSOD	Superóxido dismutase ferro
FL1	Fluorescência de laser de diodo vermelho
FS	Forward Scatter
Gel 2D	Gel de segunda dimensão
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethansulfonic acid
HRP	Peroxidase de raiz forte
IEF	Focalização isoelétrica
KPi	Fosfato de potássio
LB	Lysogeny Broth
MALDI	Dessorção/ionização à laser assistida por matriz (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MALDI/TOF	Dessorção/ionização à laser assistida por matriz – espectrometria de massa de tempo de voo (<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry</i>).
mDNA	Ácido deoxiribonucleico mitocondrial
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTP	Microtitre plate
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato reduzido
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NL	Não linear
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de cadeia de polimerase)
PMSF	Phenylmethysulfonyl fluoride
RC	Restrição calórica
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S.E.	Standard error (Erro padrão)
MD	Sintético meio com dextrose
MD-AS	Meio quimicamente definido com dextrose sem sulfato de amônio
SDS	Sodium <i>dodecyl</i> sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SGD	Saccharomyces Genome Database
SOD	Superóxido dismutase
SS	Side scatter
TAMRA	4-Carboxytetramethylrhodamine <i>N</i> -succinimidyl ester
TBE	Tampão contendo Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tampão contendo Tris e EDTA
TEL	Tampão contendo Tris, EDTA e lítio
TFA	Trifluoroacetic acid
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
WT	<i>Wild type</i>
YNB	Y east N itrogen B ase
YPD	Y east Extract P eptone D extrose

Linhagens, Mutantes e Hiperexpressores

BY4741	WT	Célula selvagem derivada da linhagem S288C;
	Mutantes nulas:	Nulas para as proteínas:
	<i>npt1Δ</i>	Nicotinato fosforibosiltransferase, atua na via de recuperação de biossíntese de NAD ⁺ ; necessária para silenciar a rDNA e os telômeros; tem papel no silenciamento de <i>loci mating-type</i> , no núcleo
	<i>lpd1Δ</i>	Diidrolipoamida desidrogenase, componente lipoamida desidrogenase (E3), dos complexos multienzimáticos da piruvato desidrogenase e α cetoglutarato desidrogenase.
	<i>bat2Δ</i>	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada.
	<i>gdh1Δ</i>	Glutamato desidrogenase NADP ⁺ dependente citoplasmática, sintetiza glutamato a partir da amônia e α-cetoglutarato.
	<i>gdh2Δ</i>	Glutamato desidrogenase NAD ⁺ dependente mitocondrial, degrada glutamato a amônia e α -cetoglutarato.
	<i>gdh3Δ</i>	Glutamato desidrogenase NADP ⁺ dependente mitocondrial, sintetiza glutamato a partir da amônia e alfa-cetoglutarato.
	Hiperexpressoras:	
	TEF-GDH2	Glutamato desidrogenase NAD ⁺ dependente mitocondrial, degrada glutamato a amônia e α-cetoglutarato; Expressão ectópica
EG118	WT	<i>S. cerevisiae</i> deficiente em SOD1
	Hiperexpressoras:	Expressão epissomal
	hWT	SOD1 humana selvagem
	G93A	SOD1 humana com mutação na interface do dímero, relacionada a fELA;
	A4V	SOD1 humana com mutação no sítio ativo da enzima, relacionada a fELA;

Sumário

1 Introdução.....	15
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo em envelhecimento	16
1.2 A mitocôndria e as espécies reativas de oxigênio	17
1.3 Repressão por glicose em leveduras	22
1.4 Proteômica mitocondrial.....	24
1.5 Metabolismo de aminoácidos e longevidade	26
1.6 Doenças Neurodegenerativas e Envelhecimento	28
1.7 O metabolismo de NAD e o envelhecimento em <i>S. cerevisiae</i>	30
3. Objetivo	32
2. Materiais e Métodos.....	33
3.1 Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	33
3.2 <i>Western Blotting</i>	34
3.3 Construção das mutantes de metabolismo.	35
3.3.1 PCR	35
3.3.2 Clonagem do gene GDH2	36
3.3.3 Preparação de <i>E. coli</i> HB101 recA ⁺ (RR1) competentes	36
3.3.4 Transformação de <i>E. Coli</i> competentes	37
3.3.5 Minipreparação de plasmídeos.....	38
3.3.6 Preparação de plasmídeos em larga escala	38
3.3.7 Transformação de leveduras.....	39
3.4 Meios de Cultura.	40
3.5 Isolamento de Mitocôndrias.	40
3.6 Medida da Liberação de H ₂ O ₂	41
3.7 Preparação de extrato proteico de leveduras.	41
3.8 Ensaio de Longevidade em <i>S. cerevisiae</i>	41
3.8.1 integridade reprodutiva.....	41
3.8.2 Monitoramento da viabilidade	42
3.8.2.1. Calceína-AM	42
3.8.2.2 FUN 1 [®]	42
3.9 Proteoma mitocondrial.	43
3.9.1 Isolamento de Mitocôndrias.....	43
3.9.2 Avaliação da qualidade proteica.....	43

3.9.3 Denaturação das mitocôndrias.....	43
3.9.4 Clean – Up.....	44
3.9.5 Quantificação proteica	44
3.9.6 Eletroforese em gel diferencial em duas dimensões (2D-DIGE).....	44
3.9.6.1 Focalização isoeletrica.....	44
3.9.6.2 Gel SDS	45
3.9.7 Análise das imagens.....	45
3.9.8 Extração das manchas proteicas de interesse	46
3.9.9 Identificação proteica	46
3.9.9.1 Extração proteica por digestão com tripsina	46
3.9.9.2 Cristalização do conteúdo proteico sobre placa Maldi / TOF	47
3.9.10 Análise do conteúdo proteico.....	47
3.10 Espectros mitocondriais.	47
3.11 Atividade enzimática do citocromo oxidase.	47
3.12 Ensaio enzimáticos de NADH citocromo c redutase.	48
3.13 Atividade enzimática da fumarase.	48
3.14 Atividade enzimática da NAD – Glutamato desidrogenase e da NADP ⁺ - glutamato desidrogenase.	48
4. Resultados e discussão.....	49
4.1 Restrição calórica e tempo de vida cronológico	49
4.2 Efeitos da restrição calórica sobre processos metabólicos e redox que afetam a longevidade	50
4.3 Papel mitocondrial sobre a longevidade de <i>S. cerevisiae</i>	52
4.3.1 Diidrolipoil desidrogenase: envolvimento na longevidade e produção de EROs em <i>S. cerevisiae</i>	52
4.3.2 Respiração Mitocondrial versus fermentação	55
4.4. Envelhecimento e proteoma mitocondrial	61
4.5. Efeito do metabolismo de aminoácidos e da restrição calórica sobre a longevidade	70
5. Conclusões	81
6. Referências.....	83
7. Material Suplementar	103
8. Anexos	116

1 Introdução

O envelhecimento é caracterizado como um declínio funcional tempo-dependente, levando o organismo à incapacidade de continuar viável diante de mudanças externas e internas, como consequência de dois processos biológicos interdependentes: a perda da funcionalidade e a perda da resistência ou capacidade de se adaptar ao estresse (revisado em Yu, 1996). Não há um fator único que leve ao envelhecimento e múltiplas teorias tentam explicar suas causas (Medvedev, 1990). Entretanto, dentre essas muitas teorias pode-se tirar um consenso de que no envelhecimento, o organismo falha ao manter sua homeostase (Yu, 1996).

Uma forma reconhecida de se retardar o envelhecimento e prolongar a longevidade é a restrição calórica (RC). McCay e Crowell mostraram em 1934 que a diminuição da ingestão de calorias sem falta de nutrientes essenciais é capaz de aumentar a longevidade de ratos. Atualmente, estudos demonstram que animais, incluindo roedores e possivelmente primatas, podem ter extensão na longevidade quando submetidos a dietas de RC. Nesses animais, a RC resulta num retardamento do envelhecimento e consequente aparecimento de condições patológicas típicas da idade (revisado em Merry, 2000).

As alterações metabólicas resultantes da RC vêm sendo apontadas como principal motivo para o retardamento do processo de envelhecimento (Merry, 2000; Jazwinski, 2001). Em mamíferos, foi observado que a RC diminui a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a oxidação de DNA mitocondrial (mDNA) (Lopes-Torres *et al.*, 2002). Também está claro que a hiperexpressão de antioxidantes estende a expectativa de vida em *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e camundongo (Matsuo, 1993; Sohal e Weindruch, 1996, Schriener *et al.*, 2005), sugerindo que EROs mitocondriais devem contribuir para o envelhecimento.

Além de alterações redox e de taxas metabólicas, outros mecanismos moleculares e vias genéticas responsáveis pelo envelhecimento vêm sendo identificados, incluindo atividades de quínases, rDNA extracromossômico circular, alterações de mecanismos de replicação e produção/redução de NAD (Morris *et al.*, 1996; Sinclair e Guarente, 1997; Defossez *et al.*, 1999; Lin *et al.*,

2000). Esses estudos se baseiam principalmente em observações utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

1.1 Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudo de envelhecimento

Saccharomyces cerevisiae vem sendo amplamente utilizada como modelo eucariótico para estudos de biologia molecular e celular e em estudos sobre envelhecimento. Além de fácil manipulação, baixo custo e tempo de replicação e curta longevidade, se comparado com mamíferos, *S. cerevisiae* foi um dos primeiros eucariotos a possuir sequência genômica totalmente sequenciada (Goffeau *et al.*, 1996) e disponibilizada na forma de database (SGD; <http://www.yeastgenome.org>, revisado em Mager e Winderickx, 2005). A grande quantidade de dados coletados a partir de ferramentas genômicas, como a análise de transcriptoma, metaboloma, interactoma e proteoma (Lashkari *et al.*, 1997; Jewett *et al.*, 2006; Villas Boas *et al.*, 2005; Uetz *et al.*, 2000; Lee, 2002; Harbison *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2001; Usaite *et al.*, 2008) estão contribuindo valiosamente com informações, fazendo da levedura um dos organismos de maior quantidade de informações em bancos de dados disponíveis. *S. cerevisiae* possui uma vasta coleção de mutantes disponíveis comercialmente, e é um organismo de fácil intervenção genética e metabólica.

Leveduras e humanos possuem vários genes ortólogos em comum e várias vias metabólicas são conservadas em ambos organismos. Dessa maneira, estudos sobre a função de uma proteína humana podem ser realizados em estudos em ortólogos de leveduras e genes que são envolvidos em doenças humanas podem ser expressos em leveduras e suas interações com outros componentes da célula eucariótica podem ser estudadas (revisado em Petranovic e Nielsen, 2008).

O modelo de RC em *S. cerevisiae* é realizado através da diminuição de glicose no meio de cultura de 2,0% para 0,5%, levando a um aumento do tempo de vida replicativo (Lin *et al.*, e Jiang *et al.*, 2000) e do tempo de vida cronológico (Barros *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2007)

A divisão de *S. cerevisiae* ocorre por brotamento assimétrico, dando

origem a uma célula mãe e uma célula filha. Em 1950, Barton propôs que a célula mãe acumulava cicatrizes retendo parte da sua identidade durante a divisão, como herança linear, enquanto na célula filha, a parede celular parecia ser recém-sintetizada. Uma célula filha não se formaria novamente do lado da cicatriz deixada pela outra célula brotada na célula mãe. A partir dessas observações Mortimer & Johnston (1959) propuseram que a longevidade dessas células poderia ser mensurada através da depleção de sítios de brotamento na célula mãe, ou ainda, que *S. cerevisiae* tem um limite no número de gerações. Dessa maneira o total de brotamentos, ou o total de gerações de uma célula, foi considerado uma medida de longevidade, atualmente chamado de tempo de vida replicativo. Curiosamente, a divisão assimétrica por brotamento também denota uma distribuição diferencial de moléculas intracelulares, distinguindo, dessa maneira, seus destinos e marcação para fatores de senescência da célula mãe. Essa assimetria, contudo, diminui conforme o envelhecimento replicativo aumenta (Kennedy *et al.*, 1994; Henderson and Gottschling, 2008).

S. cerevisiae também pode permanecer viável em condições de baixa replicação. O envelhecimento em leveduras também pode ser monitorado através do tempo como uma medida de sobrevivência da célula, ou ainda viabilidade metabólica, geralmente monitorada quando as células entram na fase estacionária, chamada de tempo de vida cronológico (Müller *et al.*, 1980; Longo *et al.*, 1996). Nesse caso, as células são crescidas em meio líquido e alíquotas são colhidas em determinados períodos para ser avaliada a viabilidade celular, monitorada através da habilidade de formar colônias ou pela capacidade metabólica (Oliveira *et al.*, 2008, revisado em Parrella e Longo, 2008; Barros *et al.*, 2010).

1.2 A mitocôndria e as espécies reativas de oxigênio

A fosforilação oxidativa é o centro do metabolismo energético em plantas, animais e em várias das formas de vida microbianas (Frey e Manella, 2000). Em eucariotos, esse processo ocorre na mitocôndria. A mitocôndria é uma organela citoplasmática cercada por duas membranas cuja principal função é a produção da maior parte dos compostos fosfatados necessários para o balanço energético da célula. Além disso, destacam-se outras funções

como a regulação da geração de calor do organismo (Nicholls e Locke, 1984; Kowaltowski *et al.*, 1999; Kowaltowski, 2000), participação na morte celular programada (Lemasters *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1998; Green e Reed, 1998) e a produção e sinalização de EROs. A vitalidade celular esta diretamente relacionada com a mitocôndria, e disfunções mitocondriais são frequentes causas de morte celular acidental (Griffiths e Halestrap, 1995; Lemasters *et al.*, 1998; Halestrap *et al.*, 1998; Friberg *et al.*, 1998), câncer (Chane *et al.*, 2010; D'Sousa *et al.*, 2010), diabetes (Dey e Swaminathan, 2010; Tseng *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2010) e doenças neurodegenerativas (Pickrell e Moraes, 2010; Cassina *et al.*, 2008).

O fracionamento dos componentes da cadeia respiratória de elétrons pode ser conseguida com certos detergentes, que quando empregados a baixa concentração, quebram as interações entre proteínas e lipídeos nas membranas, deixando as associações entre proteínas intactas (Nicholls e Ferguson, 2002). Assim, a cadeia de transporte de elétrons pôde ser fracionada em quatro complexos, denominados complexo I (ou NADH-Ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (Ubiquinol -citocromo c oxidorreductase, ou complexo *bc₁*) e complexo IV (citocromo c oxidase). O complexo V é também conhecido como ATP sintase. Apesar da glicerolfosfato desidrogenase e da ETF-ubiquinona oxidorreductase não terem a nomenclatura de complexos, eles são conectados à cadeia de transporte de elétrons como os complexos I e II.

Os carreadores redox dentro da cadeia de transporte de elétrons consistem de flavoproteínas, que contém FAD ou FMN fortemente ligados como grupos prostéticos, as proteínas ligadas a cobre, proteínas de centro ferro-enxofre (sem grupo heme férrico), ubiquinona que é um cofator livre, solúvel em lipídeo, e finalmente citocromos, com porfirinas como grupos prostéticos. Os citocromos foram os primeiros componentes a serem detectados, graças a seu distinto sensível centro redox com espectro visível (Nicholls e Ferguson, 2002).

EROs compreendem uma variedade de moléculas derivadas do oxigênio molecular, enquanto radicais livres são espécies com elétrons desemparelhados. O maior sítio intracelular de formação de EROs na maioria dos tecidos é a mitocôndria (Chance & Boveris, 1979; Turrens e Boveris, 1980).

Nela a cadeia de transporte de elétrons gera continuamente água a partir de O_2 através da redução eletrônica ao nível da citocromo c oxidase. Esses elétrons alcançam a citocromo c oxidase pela transferência sequencial a partir da redução de outros componentes, e são inicialmente removidos a partir de NADH e $FADH_2$. Durante essa transferência, uma pequena porção de elétrons é perdida em etapas intermediárias na cadeia de transporte de elétrons, principalmente nos complexos citocromo *bc1* (complexo III) e NADH: ubiquinona oxidoredutase sensível a rotenona (complexo I) em mamíferos (Kowaltowski *et al.*, 2009), levando a uma redução monoeletrônica de O_2 .

Essa redução monoeletrônica de O_2 resulta na formação de ânions de radical superóxido, que podem ser dismutados a H_2O_2 por ação de uma família de metaloenzimas conhecidas por superóxido dismutases (SODs). Três diferentes SODs são conhecidas, a SOD de cobre e zinco (CuZnSOD, ou SOD1), presente em maior quantidade em eucariotos, no citosol e em pequena quantidade em lisossomos, núcleo e no espaço intermembranas mitocondrial; a manganês SOD (MnSOD, ou SOD2), expressa em bactérias, plantas e mitocôndrias e ferro SOD (FeSOD), encontrada em alguns tipos de bactérias, algas e plantas (Fridovich, 1995). O H_2O_2 pode ser removido por ação da catalase ou por ação de outras peroxidases (Fridovich, 1995; Turrens, 2003).

Em mitocôndrias de *S. cerevisiae*, o complexo I é ausente, mas existem três NADH desidrogenases localizadas na membrana mitocondrial que não bombeiam prótons, são insensíveis a rotenona, e não estão acopladas a geração de força próton-motriz. Isso contribui para a baixa estequiometria de ATP na oxidação fosforilativa de *S. cerevisiae* (Bakker *et al.*, 2001). O NADH gerado na matriz mitocondrial é oxidado pela NADH desidrogenase interna (Ndi1p). Assim como as mitocôndrias de plantas e fungos, mas não a de mamíferos, a mitocôndria de *S. cerevisiae* é capaz de oxidar diretamente o NADH citosólico (Ohnishi *et al.*, 1966 e Onishi 1973). Duas desidrogenases externas, Nde1p e Nde2p, localizadas na membrana mitocondrial interna e com os seus sítios ativos voltados para o espaço intermembranas oxidam diretamente o NADH citosólico (Small e McAlister-Henn 1998). Fang e Beattie (2003), através de utilização de diferentes substratos e inibidores, mostraram que a produção de EROs resulta da transferência de elétrons para o oxigênio a partir da NADH desidrogenase externa, mas aparentemente não da NADH

desidrogenase interna, como ocorre em eucariotos superiores, a partir do complexo III (figura 1).

Além da cadeia de transporte de elétrons, estudos recentes em tecidos de mamíferos mostraram que proteínas pertencentes ao complexo α -cetoglutarato desidrogenase, localizada na matriz mitocondrial, são também fonte de EROs, em um mecanismo estimulado pela baixa concentração de NAD^+ (Starkov *et al.*, 2004; Tretter e Adam - Vizi, 2004). Em *S. cerevisiae*, demonstramos que a deleção do gene *LPD1*, que leva à inatividade da enzima diidrolipoil desidrogenase, subunidade E3 do complexo da piruvato desidrogenase, também gera uma diminuição da produção de EROs. Este achado chama atenção à importância de outras proteínas mitocondriais, que não as associadas à cadeia de transporte de elétrons, na regulação do balanço redox e consequentemente na viabilidade celular e longevidade (Tahara *et al.*, 2007).

O complexo multienzimático da piruvato desidrogenase é localizado na matriz mitocondrial e é composto por 3 enzimas: piruvato desidrogenase (E1), diidrolipoil transacetilase (E2) e diidrolipoil desidrogenase (E3). Em mamíferos e em algumas leveduras, a subunidade E3 do complexo da piruvato desidrogenase é compartilhada por outros complexos: complexo da α -cetoglutarato desidrogenase e o complexo da desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada. As reações que ocorrem em cada um dos complexos (**fig. 2**) se assemelham e possuem como cofatores a tiamina pirofosfato, ligada à E1, o ácido lipóico, com ligação covalente à Lys em E2, a coenzima A, substrato para E2, a flavina adenina dinucleotídeo, FAD, ligada a E3 e a nicotidamida adenina nucleotídeo, NAD^+ , substrato para E3 (revisado em Yeaman, 1989).

Fig. 2 – Complexo multienzimático da piruvato desidrogenase. O complexo da piruvato desidrogenase possui três enzimas: piruvato desidrogenase (E1), diidrolipoil transacetilase (E2) e diidrolipoil desidrogenase (E3). Retirado de Lehninger Principles of Biochemistry, 4th edition.

Dickinson & Dawes (1992) mostraram que ausência de lipoamida desidrogênase em *S. cerevisiae* leva ao acúmulo de oxoácidos, levando a falhas no metabolismo de aminoácidos e que a descarboxilação nessas células é especificamente atribuída à 2-oxoácido desidrogenase. A descarboxilação de 2-oxoácidos em *S. cerevisiae* era anteriormente atribuída exclusivamente a uma carboxilase em que haveria a redução de um aldeído em uma reação dependente de NADH geradora de álcool na via de Ehrlich (Sentheshanmuganathan, 1960; Woodward & Cirillo, 1977).

1.3 Repressão de Glicose em Leveduras

Em organismos aeróbicos, a glicólise e a fosforilação oxidativa são coordenadas para completar a demanda energética. Dessa maneira, *S. cerevisiae* é um organismo aeróbico facultativo e pode aproveitar a glicose para obtenção energética tanto pela via aeróbica, via respiração mitocondrial, quanto via anaeróbica através da fermentação, estando propensas a dois efeitos: Pasteur e Crabtree. O efeito Pasteur relata o papel da disponibilidade de oxigênio sobre a cinética do catabolismo de açúcares, dessa maneira em condições anaeróbicas a via glicolítica é favorecida. O segundo efeito, Crabtree, relaciona a alta concentração de glicose com a supressão da respiração, neste caso, a glicose em altas concentrações induz a uma transição para metabolismo fermentativo. Isto é observado em células tumorais

(Crabtree, 1929), células proliferativas não tumorais (Greiner *et al.*, 1994), algumas bactérias (Mustea e Muresian, 1967), e algumas espécies de leveduras.

O efeito Crabtree não é restrito somente a células cultivadas em glicose. Em presença de manose ou galactose, *S. cerevisiae* crescidas em ambiente aeróbico são capazes de respirar e fermentar simultaneamente (De Deken, 1966). O efeito Crabtree não é notado em leveduras insensíveis a glicose, como *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* (Walker, 1998).

S. cerevisiae é capaz de crescer em diferentes fontes de carbono, apesar de glicose e frutose serem os preferenciais. Quando um desses açúcares está presente, enzimas relacionadas à utilização de outras fontes de carbono são sintetizadas em uma taxa mais lenta em um fenômeno conhecido com repressão por catabólito de carbono. Nenhum catabólito de glicose foi identificado nessa repressão, levando ao termo geral utilizado: repressão por glicose. Recentes trabalhos (Meijer *et al.*, 1998) mostraram que a repressão por glicose está relacionada primariamente com a concentração da glicose em relação ao fluxo de glicose e que a glicose por si pode ser uma molécula sinalizadora, precisando ser transportada para dentro da célula para que ocorra a repressão (Teusink *et al.*, 1998).

A adição de glicose às células crescendo em meio não fermentativo causa a indução de uma variedade de vias de transdução de sinais e ativação e inativação de uma série de proteínas (Meijer *et al.*, 1998). Glicose e outros açúcares que causam repressão podem agir de duas maneiras distintas: interferindo com ativadores da transcrição ou facilitando a ação de proteínas que são efetoras negativas na transcrição. Diferentes fontes de carbono produzem sinais que são transmitidos através de uma série de proteínas para os promotores dos genes correspondentes (revisado em Gancedo 1998).

O controle por glicose pode ser positivo ou negativo, isto é, a glicose pode ativar uma proteína repressora ou pode inibir uma proteína ativadora. Alguns dos genes que estão sob o controle da repressão por glicose codificam enzimas envolvidas na gliconeogênese, ciclo do ácido cítrico, respiração, desenvolvimento mitocondrial e utilização de outras fontes de carbono. Por exemplo, as enzimas frutose 1,6-bifosfatase, malato desidrogenase e

fosfoenolpiruvato carboxiquinase estão sujeitas à degradação em presença de glicose (Hung *et al.* 2004, Santt *et al.* 2008). A glicose também pode afetar tanto as enzimas envolvidas no metabolismo de fonte de carbono não fermentáveis, como glicerol, etanol e acetato, como no metabolismo de outros açúcares também fermentáveis, como a sacarose, a maltose e a galactose (Trumbly, 1992).

DeRisi *et al.* (1997) mostraram, através da utilização de microarranjos de DNA, que quando a fonte de carbono fermentável é exaurida, as células que passam a utilizar o etanol como fonte de carbono (mudança da fermentação para a respiração mitocondrial) apresentam grandes mudanças no perfil de expressão de mRNA. O complexo ativador de transcrição heterotrimétrica, HAP2,3,4 (do inglês *heterometric transcriptional activator complex*) é conhecido pela indução de diversos genes correlacionados com a respiração. Eles observaram um aumento de aproximadamente 9 vezes na transcrição desses genes durante a mudança diáuxica, além de varias modificações a genes relacionados as enzimas aldeído desidrogenase, acetil coenzima A sintase, enzimas envolvidas com o ciclo do ácido cítrico e com genes relacionados a biogênese do citocromo c.

1.4 Proteômica Mitocondrial

A mitocôndria contém seu próprio DNA (mDNA). Em determinadas cepas de *S. cerevisiae* o mDNA possui 85,7 quilobases (em mamíferos é de 16,5 Kb) em dupla fita de DNA circular que codifica 8 proteínas, incluindo as subunidades I, II e III do complexo IV (citocromo c oxidase), três subunidades da ATPase (codificadas pela *ATP6*, *ATP8* e *ATP9*), apocitocromo b e a proteína ribossomal Var1p. Entretanto, a grande maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo DNA nuclear (nDNA) e sintetizada no citoplasma (Laun *et al.*, 2007).

Proteoma é o conjunto total de proteínas expressa por um genoma, célula, tecido, ou organismo. Mais especificamente, é um conjunto de proteínas expressa em um dado tipo de célula, organismo e condição. Pode-se dizer que o proteoma é maior do que o genoma, especialmente em eucariotos mais complexos, em que há um número maior de proteínas do que genes. Isto

ocorre devido ao *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais, como glicosilação e fosforilação.

O conhecimento sobre quando e onde um gene é expresso nós dá informações importantes sobre o estado biológico da célula. O estudo da expressão de genes e comparação com databases da sequência genômica, disponível para *S. cerevisiae*, fornece informações sobre a expressão de genes em determinado tempo e condição. Apesar de microarranjos de cDNA serem muito informativos, essa técnica não fornece informações sobre o nível proteico e estado da proteína como resultado de transformações e da regulação pós transcricional, assim como modificações redox, já que a razão de síntese e meia vida de uma proteína pode ser alterada (Griffin *et al.* 2002, Gygi *et al.* 1999).

A análise proteômica de diferentes compartimentos subcelulares, também chamada de proteoma de organelas, facilita o entendimento de funções celulares a nível molecular. Em estudo sobre o proteoma de *S. Cerevisiae*, Sickmann *et al.* (2003) identificaram 750 proteínas localizadas na mitocôndria.

Por outro lado, o proteoma mitocondrial, ou mitoproteoma também é uma ferramenta importante para a avaliação de mudanças pós-traducionais. O proteoma mitocondrial pode fornecer um importante banco de dados para a análise de novas funções associadas a mitocôndria e a caracterização de doenças associadas a esta organela. Foi observado que em mamíferos, estados patológicos levam a mudanças pós-traducionais e deslocalização de proteínas em tecidos específicos (Balaban, 2010).

A expressão proteica e sua modulação também sofre variações em adaptação às condições do ambiente e tempo. O desempenho de fermentação de linhagens de leveduras industriais, por exemplo, depende da característica genética da linhagem, do tipo de açúcar fermentado, da disponibilidade de fonte de nitrogênio e da temperatura. Esta performance também sofre variação com o tempo (Hansen *et al.*, 2006). Mudanças no metabolismo energético, de respiração para a fermentação, levam a respostas de adaptação fisiológicas mitocondriais. Ohlmeier *et al.* (2004) mostraram que essas mudanças em *S. cerevisiae* envolvem a alteração de pelo menos 18 proteínas.

O estudo da plasticidade do componente proteico de uma organela,

célula ou organismo inteiro, ou proteoma, é realizado através da proteômica (Blackstock e Weir, 1999). Nela a expressão proteica, as modificações pós-translacionais, interações com outras proteínas, atividade, distribuição subcelular e função ao nível global são estudadas para o entendimento do sistema biológico (revisto em Patterson & Aebersold, 2003 e Douette & Sluse, 2006). A utilização de 2D-DIGE permite a visualização em um mesmo gel de múltiplas amostras de proteínas através de utilização de sondas fluorescentes (CyDyes). Essa técnica de fluorescência permite a detecção de pequenas variações na expressão de uma proteína com limite de detecção de 150 a 500 pg. (Mathy *et al.*, 2006).

1.5 O Metabolismo de Aminoácidos e Longevidade

Barros *et al.* (2004) mostraram que o uso do desacoplador 2,4-dinitrofenol (DNP) é capaz de mimetizar os efeitos da RC em leveduras. Ambos a RC e o DNP levam a um aumento do tempo de vida replicativo e cronológico em *S. cerevisiae* em mecanismo que envolve a diminuição da detecção de EROs (Barros *et al.*, 2004). Em cérebro, fígado e coração de camundongos, o uso de DNP leva a um aumento da longevidade associado a um aumento do consumo de oxigênio, diminuição do sinal de proteína carbonilada e da 8-oxo-deoxiguanosina (Caldeira da Silva *et al.*, 2008).

Embora esteja claro que a diminuição de ingestão calórica aumente a expectativa de vida, ainda não há consenso sobre o envolvimento direto do metabolismo de aminoácidos sobre a longevidade de mamíferos. Caro *et al.* (2008) mostraram que a diminuição de metionina na dieta leva a uma diminuição do estresse oxidativo em fígado de roedores. O mesmo grupo mostrou que a diminuição de aminoácidos em 40%, exceto pela metionina, mantendo-se a mesma quantidade de calorias na dieta de ratos por sete semanas não altera o consumo de oxigênio, detecção de EROs ou a marcação de 8-oxo-deoxiguanosina (Caro *et al.*, 2009).

Por outro lado, Hagopian *et al.* (2003) mostraram que a RC aumenta as atividades de enzimas associadas a gliconeogênese e as transaminases, entre elas aspartato, alanina, tirosina, histidina, fenilalanina, triptofano transaminases, aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina

e valina), além das atividades da malato e da glutamato desidrogenase. Em *S. cerevisiae*, a diminuição de aminoácidos, ou a ausência de aminoácidos (exceto os aminoácidos de complementação auxotrófica da linhagem) no meio de cultura definido quimicamente sem mudanças na concentração de glicose, leva a aumento do tempo de vida replicativo (Jiang *et al.*, 2000).

Alvers *et al.* (2009), mostraram que o tempo de vida cronológico pode ser modulado por mudanças de aminoácidos no meio de cultura sintético, especialmente os aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, valina, isoleucina e treonina, precursor da via biossintética de isoleucina. Além disso, a disponibilidade de aminoácidos é capaz de regular vias importantes de comunicação intracelular relacionadas também a longevidade de leveduras, como as via de sinalização retrograda (RTG) e de TOR (revisado em Barros *et al.*, 2010).

Dois sistemas proteolíticos contribuem para a remoção de componentes intracelulares: o sistema de ubiquitina proteossomo e o sistema autofágico. Mitocôndrias senescentes podem acumular dano oxidativo devido a um aumento da geração de EROs, e podem ser deficientes na produção de ATP, perturbando a manutenção da viabilidade das células. Dessa maneira, devem ser eliminados. O proteossomo é incapaz de degradar organelas. Macroautofagia ou autofagia é uma importante via de degradação de proteínas danificadas, mDNA, lipídios de membrana e organelas que podem se acumular no processo de envelhecimento. Em mamíferos, a autofagia impede a neurodegeneração e câncer e está envolvida na eliminação de patógenos (revisto em Levine & Kroemer 2008, Cuervo *et al.*, 2005). Em leveduras, ela é ativada através da diminuição de aminoácidos ou fontes de baixa qualidade de nitrogênio no meio de cultura. Supressões de ATG - do inglês *autophagic-related genes* - diminuem o tempo de vida cronológico (Alvers *et al.*, 2009). Linhagens de mutantes nulos para ATG são incapazes de degradar mitocôndrias em fase estacionária, levando à deficiência de crescimento em meio não fermentativo, redução no consumo de oxigênio, aumento de EROs e aumento da frequência de *petits* (Zhang *et al.*, 2007).

O principal regulador da autofagia é a TOR quinase, que inibe a autofagia na presença de fatores de crescimento (mamíferos) e nutrientes (Lum *et al.*, 2005). Kaeberlein *et al.* (2005) examinaram o envelhecimento replicativo

de 564 deleções únicas de genes e descobriram 13 linhagens com longevidade aumentada, incluindo FOB1, cuja deleção aumenta a longevidade, reduzindo a formação de ERCs, e outros 6 genes envolvidos na via de sinalização de TOR (do inglês *Target of Rapamycin*).

Proteínas TOR foram identificadas pela primeira vez por mutações de TOR1-1 e TOR2-1 que conferem resistência a rapamicina, um macrolídeo bacteriano usado como um imunossupressor e que é capaz de ligar e inibir a FKBP-FK506 *binding protein rapamycin* (Heitman *et al.*, 1991), que então liga TOR em uma região denominada FRB (*FKBP-rapamycin binding*) - revisto em Wullschleger *et al.*, 2006. TOR é conservada através de espécies de mamíferos, moscas e vermes e regula múltiplos processos celulares em resposta à disponibilidade nutricional, o transporte de nutrientes, autofagia, entrada na fase estacionária (G0) (Zheng & Shereiber, 1997), tradução, transcrição, biogênese de tRNA e ribossomo, organização da actina, sinalização da proteína quinase C e resposta ao estresse (revisto em Schmelzle & Hall, 2000).

Sch9 é uma quinase sensível a nutrientes e homóloga à Akt/proteína quinase B e S6K em mamíferos envolvida no controle de numerosos processos de nutrientes sensíveis, incluindo a regulação do tamanho das células, a progressão do ciclo celular e resistência ao estresse (revisado por Sobko, 2006). A deleção de *TOR* ou *SCH9*, substrato para Torc1 em levedura (Urban *et al.*, 2007), leva a um aumento do tempo de vida replicativo (Kaeberlein *et al.*, 2005) e cronológico (Powers *et al.*, 2006, Bonawitz *et al.*, 2007, Wei *et al.*, 2008). A deleção de *TORC1* aumenta a respiração através do aumento da tradução de complexos da via de oxidação fosforilativa codificado pelo mDNA, como por exemplos as subunidades Cox2p e Cox3p da citocromo c oxidase, Cox2p e Cox3p (Bonawitz *et al.*, 2007).

1.6 Doenças Neurodegenerativas e Envelhecimento

Enquanto o envelhecimento é um fenômeno estocástico, a maioria das funções bioquímicas e fisiológicas se tornam atenuadas com o envelhecimento, com acúmulo de substâncias deletérias, modificação ou dano a estruturas (danos a parede celular, alterações de proteínas, glicação, modificação

oxidativa de lipídeos e carboidratos), falha de informação (substituição de bases e deleções, prejuízo transcricional e traducional) e falha na coordenação de sistemas (neural, neuroendócrino e endócrino) (Hyun *et al.*, 2006; Yu, 1996). De uma maneira geral o envelhecimento é associado com uma variedade de doenças, incluindo diabetes, câncer e desordens neurológicas (Blasco, 2005).

O sistema nervoso central é particularmente sensível ao dano ocasionado por desbalanço redox por várias razões, incluindo um baixo nível de enzimas antioxidantes (catalase e glutathione peroxidase), um grande conteúdo de substratos facilmente oxidáveis (como membrana de lipídios polinsaturada e proteínas) e um crescente fluxo de EROs gerado durante reações neuroquímicas como a oxidação da dopamina (Halliwell, 1992). Deste modo, alterações metabólicas ou redox que levam a desbalanço redox frequentemente levam à doenças neurodegenerativas.

A RC é capaz de modular mudanças biológicas relacionadas ao envelhecimento, como síntese e degradação proteica, geração de EROs, peroxidação lipídica e funções mitocondriais, e amenizar condições de lesões patológicas, como tumores e catarata (Yu, 1996).

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença degenerativa neuronal motora que normalmente se instala aos 50-60 anos e afeta aproximadamente 1 em cada 10.000 pessoas. Entre 10 e 15% desses casos são hereditários e 20 a 25% dos casos são de ELA familiar (fELA) são associados a mutações na SOD1, gene que codifica a CuZnSOD humana (Rosen *et al.*, 1993). Ratos transgênicos que expressam a CuZnSOD humana normal (*wild type*, WT), ou os ratos nocauteados para essa proteína não desenvolvem a doença, sugerindo que seu desenvolvimento está ligado a um ganho de função pela CuZnSOD mutada (Gurney *et al.*, 1994; Gurney 1997; Dal Canto & Gurney 1997; Reaume *et al.*, 1996), que apesar da diminuição, não perde sua atividade catalítica (Deng *et al.*, 1993, Rabizadeh *et al.*, 1995).

O estudo da toxicidade em células contendo SOD mutante mostra que os danos se dão preferencialmente a mitocôndrias de medula espinhal em que a CuZnSOD mutada aparece preferencialmente sob a forma agregados ligados a componentes integrais da membrana mitocondrial voltadas para o citoplasma (Liu *et al.*, 2004). Outras evidências da participação mitocondrial em danos em ELA são alterações no complexo IV na cadeia de transporte de elétrons em

estágios primários da doença, com posterior perda de citocromo c pela mitocôndria em estágio sintomático, perda do potencial de membrana mitocondrial, seguido de aumento de concentração citosólica de cálcio (Carri *et al.*, 1997). O efeito neuroprotetor da ciclosporina A em ELA (Karlsson *et al.*, 2004; Kirkinezos *et al.*, 2005), conhecido inibidor do canal de transição de permeabilidade mitocondrial, confirma a importância de alterações oxidativas mitocondriais na patologia desta doença.

1.7 O metabolismo de NAD e o envelhecimento de S. cerevisiae

O aumento da longevidade mediado por RC pode ser bloqueado por mutações que comprometem a geração de NAD⁺ ou a atividade de uma enzima histona deacetilase dependente de NAD⁺, chamada sir2 (*silent information regulator 2*)

Sinclair e Guarente (1997) mostraram que uma das causas do envelhecimento em leveduras era o acúmulo de espécies circulares de rDNA. Durante a divisão assimétrica em leveduras, esses círculos de rDNA extracromossomal (ERCs, do inglês *extrachromosomal rDNA circles*) são acumuladas nas células mães e são causas da diminuição do tempo de vida replicativo em *S. cerevisiae*.

Kenned *et al.* (1995) encontraram 8 linhagens, entre eles *SIR4-42*, em uma seleção de mutantes que apresentavam o tempo de vida replicativo aumentado. A extensão do tempo de vida era dominante no alelo de *SIR4-42*. Mutações em *SIR2* ou *SIR3*, parte do complexo da SIR, aboliam o aumento da longevidade, chamando a atenção para essa família de proteínas deacetilases.

Independentemente da participação de ERCs sobre a diminuição do tempo de vida replicativo em leveduras, Lin *et al.* (2000) mostraram que a Sir2p e NAD⁺ são necessários para os efeitos benéficos da RC sobre o tempo de vida replicativo. A ausência do gene *NPT1*, que codifica uma enzima pertencente à rota de síntese de NAD, em leveduras leva a um aumento do envelhecimento.

O mutante simples de Sir2p apresenta diminuição de aproximadamente 50% no tempo de vida replicativo, enquanto a hiperexpressão leva a um

aumento (Kaeberlein, McVey e Guarente, 1999) e está envolvida com a diminuição da formação de ERCs.

Lin *et al.* (2002) mostraram que a RC em *S. cerevisiae* leva a a um aumento da atividade de Sir2p. A RC leva a aumento da respiração mitocondrial (Lin *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2004) e da relação NAD^+/NADH , aumentando o substrato para a Sir2p e dessa maneira a longevidade.

2 Objetivo

O objetivo geral desse trabalho foi utilizar o modelo de RC em *S. cerevisiae* BY4741 para estudo sobre possíveis modulações redox, proteicas e metabólicas mitocondriais associadas ao envelhecimento de leveduras.

3 Materiais e Métodos

3.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Foram utilizadas linhagens de *S. cerevisiae* BY4741, incluindo células *wild-type*, *npt1Δ*, nulas para proteínas envolvidas na rota biossintética de NAD^+ (veja Fig. 3, Panozzo *et al.*, 2002) e *lpd1Δ* (que não apresentam a porção E3 da diidrolipoil desidrogenase), obtidas da coleção EUROFAN e mutantes nulas em vias do metabolismo de aminoácidos *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* e *gdh3Δ*, que codificam a aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada citosólica, NADP-glutamato desidrogenase citosólica, NAD-glutamato desidrogenase mitocondrial e NADP-glutamato desidrogenase mitocondrial,

além de *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. Também utilizamos *S. cerevisiae* EG118 deletadas para a *Sod1p*, fenotípica de EG118, e que superexpressam a CuZnSOD humana normal e as relacionadas com ELA, G93A e A4V, com mutação na interface do dímero e no sítio ativo da enzima, respectivamente doadas pela prof^a. Maria Tereza Carri, do laboratório do Laboratory of Neurochemistry, Roma, Itália. A presença dos plasmídios nas linhagens de EG118 foram garantidas graças à presença do marcador seletivo *LEU2* e western blotting.

Fig. 3 – Vias de síntese de NAD em *S. cerevisiae* a partir de triptofano ou nicotinato (Panozzo *et al.*, 2002)

Fig. 4

human wild type SOD or human ALS mutants
in YEP351 with ySOD promoter driven expression

3.2 Western blotting. Western Blotting foi realizado de acordo com Banerjee *et al.* (1998). As leveduras foram lavadas com água ultrapura (2x) a 2000 g por 5 minutos a temperatura ambiente e ao precipitado foram adicionadas 100 μ L de solução desnaturante contendo Tris-Cl 0,2 M, SDS 4%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 4%, bromofenol 0,1%. As amostras foram deixadas em banho-maria a 90°C por 10 minutos e guardadas a -80°C até o dia de utilização. As amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, num gel de 12% acrilamida/Bis-acrilamida, Tris-Cl 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1%, TEMED 0,02%, persulfato de amônio 0,1%. 60 μ g de proteína foram aplicadas. A eletroforese foi realizada a 100 mV e 25 mA a 4°C. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) como descrito por Towbin *et al.* (1979). A transferência foi realizada a 100 V, 400 mA por 2 horas em solução contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037%, 20% metanol, pH 8,3. A membrana foi lavada por 15 minutos com TBS-T (KCl 2,7 mM, NaCl 138 mM, Tris 20 mM, 0,1% de tween 20, pH = 7,4) e incubada por 12 horas,

sob agitação em tampão de bloqueio (TBS-T, 1% de leite desnatado e 1% de BSA). A membrana foi incubada com TBS-T e o anticorpo primário anti hSOD (Calbiochem) na diluição de 1:1500 por 1 hora. A membrana foi lavada com TBS-T, rápida (2x), incubando por 10 minutos (2x), incubando por 5 minutos (2x). Seguiu-se a incubação da membrana com TBS-T com anticorpo secundário IgG mouse (1: 7000, anticorpo marcado com peroxidase de raiz forte). As membranas foram então lavadas como descrito anteriormente. Os locais de ligação do anticorpo foram visualizados utilizando-se o kit SuperSignal® West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific), de acordo com as especificações do fabricante.

Fig. 5 – O crescimento de leveduras mutadas para a SODs humana em meio rico e a expressão de superóxido dismutase. 60 μ M de extrato total de leveduras EG118 hWT, G93A e A4V foram submetidas a Western blotting.

3.3 Construção de mutantes de metabolismo de aminoácidos:

3.3.1 PCR: A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada pela reação de polimerase em cadeia - PCR (Sambrook *et al.*, 1989) exceto por algumas variações. A solução utilizada foi: 20 μ l de tampão de polimerase (5x) com $MgCl_2$ (Finnzymes®), dNTPs (0.2 mM), 0,5 pmol/ μ l de cada oligonucleotídeo iniciador, 2U de *Taq Phusion HF* DNA polimerase (Finnzymes®), DNA 10 ng . O processo de amplificação foi realizado em 35 ciclos, em três etapas nas seguintes temperaturas: i) 94 °C, com desnaturação e separação da dupla fita de DNA por 1 minuto; ii) hibridação dos “primers” com a fita molde de DNA a temperatura de 55°C por 1 minuto; iii) Para a extensão da amplificação promovida pela DNA-*taq* polimerase a temperatura foi aumentada para 72 °C por 2,5 minutos. O plasmídeo recombinante (pDNA), foi construído digerindo o vetor e o DNA com enzimas de restrição (BioLabs®) com sítios específicos permitindo sua

ligação pela ação da enzima T4 DNA-ligase (BioLabs®). Os fragmentos foram separados e selecionados por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo recuperados, posteriormente, por eletroeluição (Sambrook *et al*, 1989). Os iniciadores utilizados para a amplificação da sequência do gene *GDH2* foram: 5'- GGC AGA TCT ATG CTT TTT GAT AAC AAA AAT CGC – 3' e 5' – GGC GCA TGC GAA GCT CAA GCA CTT GCC – 3'. O produto da amplificação foi purificado por extração fenol/clorofórmio. Em microtubo com capacidade de 1,5 mL foi adicionado fenol na proporção de 1:1, centrifugação e retirada da fase aquosa que foi transferida para novo microtubo. Adicionou-se igual volume de clorofórmio isoamílico 24:1. Agitou-se a mistura e após centrifugação foi recolhida a fase aquosa a qual foi adicionado NaCl 5 M na proporção de 1:20 e etanol 100% na proporção 2,5:1. A mistura foi incubada em gelo seco por 20 minutos para a precipitação de DNA. Após centrifugação de 5 minutos a 16 000 g a temperatura ambiente o produto foi lavado duas vezes com etanol 80%. O excesso de álcool foi retirado e o produto foi seco em bomba de vácuo por 10 minutos. O produto foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura.

3.3.2 Clonagem do gene *GDH2* : O produto de PCR contendo 3294 pares de base foi digerido com as enzimas Bgl2 e SphI enquanto o vetor pYip351TEF1 foi linearizado com as enzimas de restrição BamHI e SphI. da New England (BioLabs®). Os produtos das digestões foram submetidos a gel de eletroforese seguido de eluição das bandas referentes ao produto de PCR cortado e ao vetor pTEF (pYip351-TEF) linearizado: À membrana de celulose previamente hidratada, contendo a fatia de gel, foi adicionado tampão TBE 1:10. Eliminado o excesso de tampão, a membrana foi colocada na cuba eletroforética e foi aplicada a voltagem de 500V por 8 minutos. A parte líquida foi coletada e submetida a extração fenol/clorofórmio.

3.3.3 Preparação de *E. coli* HB101 *recA*⁺ (RR1) competentes: Transformação de *E. coli* com DNA exógeno e preparação de bactérias competentes, foram realizados pelo método de Sambrook *et al*. (1989). *E. coli* RR1 ((Δ (*gpt-proA*)62, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *hsd_B20*, *rpsL20* (*Str*^r), *ara-14*,

galK2, *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, *mcrB_B*) (Hanaham, 1983) foram cultivadas a 37°C por 6 horas, ou até que a O.D.₆₀₀ fosse de 0,5 e então foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o conteúdo foi ressuspensionado em 10 mL de CaCl₂ 10 mM. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensionadas em CaCl₂ 30 mM Tris-Cl 10 mM, pH 7,5 e incubadas no gelo por 40 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o conteúdo foi ressuspensionado em 5 mL de CaCl₂, 30 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 7,5.

Fig. 6 – Mapa de restrição do vetor pTEF-GDH2. O vetor pYip351 dispõe de duas marcas de seleção para ampicilina e leucina. Ao vetor integrativo Yip351 foi integrado ao promotor de TEF1 através da inserção nos sítios de SacI e BamHI. A integração do gene GDH2 foi realizada através da inserção nos sítios de BamHI e SphI do vetor.

3.3.4 Transformação de *E. coli* competentes: em microtubo de 1,5 mL foram adicionados 1 µL do pYip351TEF 1 µL do inserto, 1 µL do tampão DNA ligase 10X, Tris-Cl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, ditiotretol 100 mM, ATP 10 mM, BSA 250 µg/mL, 0,5 µL da enzima T4 ligase. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente foram adicionadas 200 µL de *E. coli* RR1. A solução contendo as células foi deixada no gelo por 10 minutos e seguiu-se

a incubação a 42°C por 2 minutos. Às amostras foi adicionado 1 mL de meio LB (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de acetado de sódio). Após 40 minutos de incubação a 37°C, as células foram centrifugadas a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em meio LB. As bactérias foram transferidas para placa LB contendo ampicilina 0,1 mg/mL.

3.3.5 Minipreparação de plasmídeos: O DNA plasmidial para transformação foi preparado segundo Birnboim e Dolly (1979). Células bacterianas cultivadas em placa de LB sólido com ampicilina (100 µg/ml) foram coletadas com uma espátula e incubadas por 1 minuto no gelo em solução contendo glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, lisoenzima 5 mg/mL e RNase 0,02 mg/mL. A essa solução foram adicionados 200 µL de solução NaOH 0,2 M, SDS 1%. A solução foi misturada por inversão. Adicionou-se 150 µL de de acetato de amônio 7,5 M. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo contendo 300 µL de isopropanol e triton X-100 0,2%. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos e lavadas 2 vezes com etanol 80%. Após secas, as amostras foram ressuspensas em 5 µL de água ultrapura. As amostras foram submetidas a digestão para confirmação da presença do vetor.

3.3.6 Preparação de plasmídeos em larga escala: Confirmada a presença do vetor contendo o inserto de interesse, cresceu-se as *E. coli* RR1, para a purificação do vetor recombinante pTEF1-GDH2 para integração ao DNA de WT BY4741 e transformação de leveduras. As células foram coletadas e transferidas para solução glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, lisoenzima 5 mg/mL e RNase 0,02 mg/mL. Após 30 minutos foram adicionados 1 mL de solução contendo 0,3% de triton X-100, EDTA 0,185 M, Tris-Cl 0,15 M, pH 7,5 a 4°C. O lisado celular foi centrifugado a 185 g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo para extração fenol/clorofórmio. Centrifugou-se a 1575 g por 10 minutos, 4°C. Lavou-se a fase aquosa pela adição de mesmo volume de clorofórmio.

Adicionou-se 1:20 NaCl e 3:1 álcool 100%. Centrifugou-se a 2600 g por 10 minutos. Colheu-se a fração inferior e adicionou-se 1,5 mL de acetato de amônio 2 M e 4,5 mL de etanol 100%. Centrifugou-se e o precipitado foi ressuspensionado em 300 µL de acetato de amônio 2 M e transferiu-se o conteúdo para um microtubo. Adicionou-se 2,5:1 de etanol 100% e lavou-se duas vezes com etanol 80%. Secou-se a amostra em bomba de vácuo.

Fig. 7 – Construção do vetor pTEF-GDH2. A integração do gene GDH2 ao vetor pYip351TEF foi confirmada através da digestão do produto da preparação de triton com as enzimas 1) HindIII gerando os fragmentos de 414, 1792 e 5859 bp, 2) BstXI gerando os fragmentos de 1870, 2110 e 4085 bp, 3) SacI e SphI, gerando os fragmentos de 4367 e 3698 bp. O padrão esta mostrado na raia P (GeneRuler™ Fermentas). As digestões foram realizadas em duplicata.

3.3.7 Transformação de leveduras. Células de *S. cerevisiae* foram transformadas utilizando-se o método de Schiestl *et al.* (1989). As células foram centrifugadas a 600 g a 21°C por 5 minutos. Adicionaram-se às células 5 mL de solução TEL (Tris-Cl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, acetato de lítio 0,1 M). Centrifugou-se. Ressuspendeu-se em 1 mL de TEL. As amostras foram distribuídas 100 µL por microtubo transferidos para o gelo. Adicionou-se 5 µL de DNA carrier salmão (10 mg/ml - Gibco®) e 2,5 µL do vetor pTEF-GDH2. Incubou-se por 20 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 700 µL de PEG 40% em TE (Tris-Cl 5mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,5) e as células foram incubadas a temperatura ambiente por 45 minutos.

Transferiu-se os microtubos para 42°C por 10 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução TE. Centrifugou-se a 16 000 g por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e as células foram espalhadas em meio seletivo.

3.4 Meios de cultura. Os meios de cultura utilizados para leveduras foram preparados de acordo com Rose *et al.* (1990), contendo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e glicose 0,5%, 2,0% e também 0,2, 1,0 e 3,0%) ou de acordo com Ausubel *et al.* (1989, capítulo 13) com a adição de 0,17% de YNB (sem aminoácidos ou sulfato de amônio), aminoácidos de acordo com o mostrado na tabela 1 e glicose na presença ou ausência de sulfato de amônio 0,5%. Outras fontes de carbono também foram utilizadas, incluindo galactose, glicerol e rafinose, onde indicado. O inóculo foi realizado pela adição de leveduras ao meio de cultura para uma O.D₆₀₀ final de 0,01 a partir de células crescidas previamente por 24 horas em meio de mesma composição do inóculo.

3.5 Isolamento de mitocôndrias. Para detecção de H₂O₂ mitocondrial em levedura nós utilizamos mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* preparadas pelo método de Faye *et al.* (1974) modificado. As leveduras crescidas até a fase estacionária foram lavadas com sorbitol 1,2 M gelado e então centrifugadas a 1000 g por 5 min a 4°C. As leveduras foram incubadas com zimoliase (30 U/g de células) por uma hora a 37°C em sorbitol 1,2 M, 2-mercaptoetanol 0,14 M, fosfato 75 mM e EDTA 1 mM, pH 7,5 (KOH). Os esferoplastos foram lavados duas vezes com sorbitol 1,2 M e centrifugadas a 4600 g, 10 minutos, 4°C e então ressuspensos em sorbitol 0,6 M, Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM e PMSF 0,1 mM, pH 7,5, e homogeneizados com auxílio de potter. A suspensões foram centrifugadas a 1600 g, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi então centrifugado a 18000 g por 10 min a 4°C. O precipitado resultante foi lavado e ressuspenso no mesmo meio. Para experimentos em que as mitocôndrias foram permeabilizadas, 100 µg foram incubadas a temperatura ambiente em 2 mL de meio utilizado nos experimentos (sorbitol 0,6 M, KPi 32,5 mM, Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 7,5), suplementado com alameticina 5 µg para

permeabilização. A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com Lowry *et al.*, 1951.

3.6 Medida da liberação de H₂O₂. A produção de peróxidos foi monitorada através da medida fluorimétrica em esferoplastos e mitocôndrias isoladas de levedura da oxidação de Amplex Red[®] 50 µM (Molecular Probes A12222) na presença de 1,0 U/mL de peroxidase de raiz forte (HRP) com comprimento de onda de excitação de 563 nm e de emissão de 587 nm (Zhou *et al.*, 1997, Ferranti *et al.*, 2003). Na presença de HRP, o Amplex Red[®] reage com H₂O₂ com estequiometria 1:1 produzindo um composto altamente fluorescente, a resorufina.

3.7 Preparação de extrato proteico de leveduras. Leveduras crescidas em YPD 0,5% e 2,0% de glicose por 16 e 64 horas foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos e lavadas duas vezes com água ultrapura para a retirada do meio de cultura. As células foram ressuspensas em fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 0,001 M pH 7 contendo PMSF 1 mM (fluoreto de fenilmetilsulfonila), de leupeptina 1,5 µg/mL e pepstatina 3 µg/mL e transferidas para um microtubo com capacidade de 1,5 mL. Ao microtubo foram adicionadas glass beads (50% do volume das células) e o conteúdo foi vortexado em sala acondicionada a 4°C por 10 minutos (duas vezes com intervalos de 5 minutos). Seguiu-se centrifugação dos microtubos a 1700 g por 3 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 20 000 g por 1 hora a 4°C para retirada de debris celular. As amostras foram congeladas a -80 °C até a utilização para monitorar as atividades enzimáticas.

3.8 Ensaios de longevidade em *S. cerevisiae*. O tempo de vida cronológico foi monitorado através da sobrevivência na fase estacionária. A sobrevivência foi avaliada através da:

3.8.1 Integridade reprodutiva, ou a habilidade de formar colônias quando plaqueado em meio sólido. Nesse procedimento 100 células foram plaqueadas em meio sólido contendo 1% de extrato de levedura, 2,0% de

peptona, 2,0% de glicose (YPD) e 2,0% de Agar. As colônias formadas foram contadas depois de 36 horas após plaqueadas.

3.8.2 Monitoramento da viabilidade

3.8.2.1 Calceína-AM: A fluorescência da calceína foi monitorada através de citometria de fluxo. A calceína AM é um marcador celular permeável a membrana e foi introduzido nas células através de incubação. Dentro da célula, a calceína é atacada por esterases e adquire carga negativa sendo retida no citoplasma de células vivas fluorecendo em verde. As leveduras foram centrifugadas a 1000 g para a retirada do meio de cultura e lavadas com água ultrapura, centrifugadas e ressuspensas em água. Foram adicionadas 2×10^6 células a 1 mL de tampão contendo sorbitol 0,6 M, KPi 32,5 mM, Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 (KOH). Os parâmetros utilizados no citômetro de fluxo foram: FS: 17,6 com ganho de 5,0; SS: 243, ganho de 50,0 e FL1 752 com ganho de 2,0; o discriminante foi de 20,0.

3.8.2.2 FUN 1[®]: Monitoramento da fluorescência do produto do metabolismo da sonda FUN 1[®] (Molecular Probes, Millard *et al.*, 1997) por esferoplastos através de espectrofluorimetria, como descrito em Kretschmar *et al.*, (1996), Barros *et al.* (2004). Essa sonda marca células metabolicamente ativas e inativas, que fluorecem a 580 e 535 nm, respectivamente, quando excitadas a 470 nm. 2×10^8 células (determinadas através da absorbância a 600 nm) foram adicionadas a 1,5 mL de tampão reacional contendo 5 uM de FUN 1[®], 2,0% de glicose, Hepes 10 mM, pH 7,5 (NaOH). A diferença de fluorescência foi determinada até a estabilização do traçado com um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F4500. O metabolismo de FUN 1[®] ocorre tanto em células aeróbicas quanto nas não aeróbicas (Milliard *et al.*, 1997) e pode ser relacionado com a habilidade da célula em formar colônia (Fabrizio *et al.*, 2003). Deve ser notado que as diferenças de fluorescência do FUN 1[®] permitem uma medida qualitativa e não quantitativa da atividade metabólica.

3.9 Proteoma mitocondrial

3.9.1 Isolamento de Mitocôndrias. Mitocôndrias para a análise funcional foram obtidas por centrifugação diferencial como em procedimento descrito por Daum *et al.* (1982). As células foram lavadas com sorbitol 1,2 M gelado, centrifugadas a 1000 g e incubadas por 15 minutos em tampão contendo sorbitol 1,2 M, KH_2PO_4 75 mM, EDTA 1 mM, DTT 30 mM (3 mL/g de célula), lavadas e ressuspensas em tampão de digestão sorbitol 1,2 M, KH_2PO_4 75 mM, EDTA 1 mM e 30 U de zimolase (3 mL/g de célula). A formação de esferoplastos foi acompanhada através da absorbância da solução. Os esferoplastos foram lavados com sorbitol 1,2 M e centrifugados a 4500 g. A lise para obtenção dos esferoplastos foi realizada em sorbitol 0,6 M, Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,5 mM, 0,02% BSA com adição de cocktail antiprotease (3 mL/g de célula). O homogenato foi centrifugado a 1600 g para precipitar o debris celular. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 12000 g. As mitocôndrias foram lavadas para retirada dos microssomos com solução sacarose 250 mM, MOPS 10 mM e EDTA 1 mM. As mitocôndrias para a análise proteômica foram purificadas em gradiente de três fases de sacarose (2,5 mL 23%, 4 mL 32% e 2,5 mL 60%) através de ultracentrifugação a 125000 g como descrito por Meisinger *et al.* (2000).

3.9.2 Avaliação da qualidade proteica - 25 µg de proteína mitocondrial foram submetidas a eletroforese em mini gel NuPAGE® Noevex Bis-Tris (Invitrogen) para certificação de que não houve proteólise das amostras.

3.9.3 Desnaturação das mitocôndrias – proteínas foram extraídas da fração mitocondrial pela adição de 500 µL de tampão de lise: ureia 7 M, tiolureia 2 M, Tris-Cl 50 mM, EDTA 1 mM, ASB 14 (detergente zwitterionico) 2% (massa/volume) suplementado com DTT 20 mM, 0,8% (v/v) IPGbuffer pH 3-10 NL, pH 7,5 e cocktail anti protease (Completo, Roche). Seguiu-se agitação intensa por 30 minutos a temperatura ambiente. As Amostras foram em seguida sonificadas por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 15000 g para remoção de material insolúvel. As amostras foram estocadas

a -80°C.

3.9.4 Clean – Up - As amostras proteicas foram precipitadas para a remoção de excesso de Tris-Cl, EDTA, DTT, DNA e outros interferentes com Cy5-labelling através de *2D clean-up kit* (G.E. Health Care). Nesta etapa as proteínas são precipitadas enquanto os interferentes continuam no sobrenadante. As amostras foram ressuspensas em ureia 7 M, tiolureia 2 M, Tris-Cl 30 mM, EDTA 1 mM, ASB 14 (detergente zwitterionic) 2% (massa/volume) pH 8,5. O pH das amostras foi ajustado em 8,5 (NaOH).

3.9.5 Quantificação proteica – A quantificação do conteúdo proteico foi realizada através do kit da (RC) DC protein assay (Bio - Rad Laboratories), uma variação do método de Lowry (1951).

3.9.6 Eletroforese em gel diferencial em duas dimensões (2D-DIGE) – A extração de proteínas e a eletroforese em gel diferencial em duas dimensões foram realizadas como descrito em Douette *et al.*, 2006.

3.9.6.1 Focalização isoeletrica - A 25 µg de extrato proteico mitocondrial foi adicionada 0,2 nmol de CyDye (Cy3 and Cy5) (G.E. Health Care), vortexadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de lisina 10 mM. O padrão interno foi estabelecido pela adição de Cy2 0,2 nmol a amostra contendo igual quantidade de todas as preparações num final de 25 µg de proteína. Esse padrão interno foi usado para a normalização e *matching* entre os géis (Alban *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2003). Cada um dos 6 géis continha cada um das amostras marcadas com Cy3 e Cy5 e o padrão interno com Cy2. O volume final das amostras combinadas foi ajustado para 450 µL com tampão de reidratação padrão (ureia 7 M, tiolureia 2 M, ASB 14 2% (m/v), DTT 25 mM, 0,6% v/v IPG buffer pH 3 – 11 NL). As amostras com os diferentes CyDye misturados foram usadas para reidratar *IPG strips* de 24 cm (pH 3-11 NL) por 8 horas a 20°C e sob voltagem constante de 50 V.

Isoelectric focusing (IEF) foram conduzidos em 6 passos 200V por 200Vh, 500V por 500Vh, 500V por 500Vh, 1000V por 2000Vh, 8000V por 13500Vh e 8000V por 60000Vh a 20°C com o máximo de 50 mA por faixa de *IPGphor IEF*. Ao final da IEF, as faixas foram lavadas com água ultrapura e quando necessário armazenadas a -80°C.

3.9.6.2 Gel SDS – Antes da separação eletroforética, as faixas IPG passaram por tratamento químico para equilíbrio em duas etapas, como descrito por Görg *et al.* (1995): redução, em que as proteínas não alquiladas são preservadas no estado reduzido da desnaturação e alquilação proteica, em que os grupos tiólicos das proteínas são prevenidos de serem reoxidados durante a eletroforese, minimizando as reações entre os resíduos de cisteína. Na etapa de redução cada faixa foi incubada por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente em solução contendo ureia 6 M, Tris-Cl 15 M, pH 8,8, glicerol 50%, SDS 2% e DTT 10 mg/mL seguida da etapa de alquilação em que cada faixa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação em solução contendo ureia 6 M, Tris-Cl 1,5 M, pH 8,8, glicerol 50%, SDS 2% e iodoacetamida 25 mg/mL. Uma pequena quantidade de azul de bromofenol foi adicionada à solução para que fosse possível monitorarmos o processo de eletroforese. As faixas foram lavadas em tampão de eletroforese (TGS) contendo Tris 25 mM, de glicina 0,2 M e 2% de SDS e seladas em com 0.5% de agarose em TGS no topo do gel de acrilamida 12% m/v. Os géis foram colocados entre placas de vidro de baixa fluorescência para minimizar o *background* de fluorescência durante o processo de escanear o gel. A eletroforese em segunda dimensão foi realizada por 10 horas a 20°C em sistema Ettan Dalt II (G.E. Health Care) com 2 watts/gel. Cada gel foi escaneado a em Typhoon 9400 (G.E. Health Care) no modo de aquisição para fluorescência com distância focal de +3 mm. Os filtros de emissão nos comprimentos de onda correspondentes a cada CyDye foram 565 nm Cy2, Blue Fam; 570 Cy3, TAMRA, AlexaFluor 546, 550 Cy5, tamanho de pixel de 100 microns.

3.9.7 Análise das imagens – As imagens foram analisadas com o software DeCyder (G.E. Health Care) de acordo com o manual do fabricante. No início as manchas contendo as proteínas marcadas com cada uma das formas de CyDye foram co-detectadas. O programa seguiu pela avaliação da razão entre a abundância da fluorescência em cada gel contendo as amostras e padrão interno através da análise de gel diferencial modo do software (DIA). Após esse processo a variação entre géis foi avaliada pelo *matching* e normalização do padrão interno, presente em cada gel pelo modo BVA (análise de variação biológica) do software Decyder[®], seguida pela verificação manual de cada poço nos padrões internos.

3.9.8 Extração das manchas proteicas de interesse - Após identificação das manchas que tiveram mudança entre as condições com significância estatística $p < 0,05$, o gel preparativo 2D contendo 250 µg de proteínas contendo todas as amostras juntas foi fixado como descrito por Shevchenko *et al.* (1996) e pelas coordenadas obtidas no software Decyder[®]. As manchas foram coletados através da utilização de Ettan Picker v1.20 e as amostras coletadas foram colocadas em placas de 96 poços.

3.9.9 Identificação proteica

3.9.9.1 Extração proteica por digestão com tripsina – Os pedaços de géis coletados foram tratados para a extração das proteínas pela previa lavagem com 100 µL de água ultrapura seguida pela lavagem com 100 µL de acetonitrila 100%, realizadas para a retirada de qualquer impureza. Após secos, aos poços contendo os pedaços dos géis foram adicionados NH_4CO_3 50 mM incubado por 20 minutos, e adicionado acetonitrila 100%. Após completa desidratação, as amostras foram incubados a 4°C em 2 µL da solução contendo NH_4CO_3 25 mM e tripsina 5ng/µL. Ao final de 15 minutos foram adicionados 5 µL de NH_4CO_3 25 mM às placas, que permaneceram a 37°C por 10 horas. Seguiu-se a extração dos peptídeos pela adição de 4 µL a cada poço de solução contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e sonicação por 10

minutos. O sobrenadante foi transferido para nova placa e estocado a - 20°C.

3.9.9.2 Cristalização do conteúdo proteico sobre placa Maldi/TOF –

As matrizes das placas MTP AnchorChip 600 – 384, placas para MALDI com 384 poços de 600 µm, foram previamente preparadas pela lavagem com etanol absoluto, água ultrapura e sonicação em metanol 50%. Após secas foram adicionadas lentamente a matriz HCCA a placa de MALDI (1 mL de acetonitrila contendo 20 mg de ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e 0,1% de TFA). A cada poço da placa de MALDI foi adicionado 1 µL do conteúdo da extração peptídica. Após seco, cada poço foi lavado delicadamente com 5 µL de solução de lavagem (TFA 0,1% e fosfato de amônio 10mM). A placa de MALDI foi mantida a 4°C até ser submetida à análise por espectroscopia de massa.

3.9.9.3 Análise do conteúdo proteico - A análise do conteúdo proteico foi realizada por espectroscopia de massas. O conteúdo proteico foi analisado com base no banco de dados NCBI (www.matrixscience.com).

3.10 Espectros mitocondriais - Os espectros dos citocromos oxidados vs reduzidos foram realizados de acordo com Tzagoloff *et al.* (1975). Os citocromos mitocondriais foram solubilizados pela adição de solução contendo deoxicolato 1%, KCl 1 M, Tris-Cl 50 mM, pH = 8,0. Amostras desse extrato foram oxidadas por ferricianeto de potássio ou reduzidas pela adição de pequena quantidade de ditionito de sódio e a diferença entre os dois espectros foi registrada à temperatura ambiente.

3.11 Atividade enzimática do citocromo oxidase – Mitocôndrias de leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* crescidas em YPD 0,5% e 2,0% de glicose por 16 e 64 horas foram lisadas pela adição de ácido deoxicólico 0,5%. Os testes enzimáticos foram realizados como descrito por Tzagoloff *et al.* (1975). Para o ensaio da citocromo oxidase, 10 a 50 µg de proteína foram adicionados à solução contendo fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5, 0,08% de citocromo c, uma pequena quantidade de ditionito foi adicionada à solução para a redução

do citocromo *c*. Após estabilização do traçado foram adicionados 1 mM de NADH. À cubeta de referência foram adicionados alguns μL de ferrocianeto de potássio a fim de oxidar o citocromo *c*. O coeficiente de extinção utilizado para calculo da atividade específica foi de $18,5 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm.

3.12 Ensaio enzimáticos de NADH citocromo c redutase– Mitocôndrias de leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* crescidas em YPD 0,5% e 2,0% de glicose por 16 e 64 horas foram lisadas pela adição de ácido deoxicolico 0,5%. Os testes enzimáticos foram realizados como descrito por Tzagoloff *et al.* (1975). Para o ensaio de NADH-citocromo *c* redutase, 10 a 50 μg de proteína foram adicionadas a solução contendo KPi 10 mM, pH 7,5, 0,08% de citocromo *c*, KCN 0,1 M. Após estabilização do traçado foram adicionados 1 mM de NADH. O coeficiente de extinção utilizado para calculo da atividade específica foi de $18,5 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm.

3.13 Atividade enzimática da fumarase – A atividade da fumarase foi monitorada através da absorbância a 250 nm pela adição de 10 μg a 50 μg de proteína a 1 mL de tampão contendo fosfato de sódio 50 mM, malato 50 mM, pH 7,3. O $\epsilon_{(250)}$ fumarase = $1,45 \cdot 10^6 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$, caminho óptico da cubeta foi de 1 cm, como descrito por Hill e Bradshaw (1969).

3.14 Atividade enzimática da NAD-glutamato desidrogenase e da NADP-glutamato desidrogenase – A atividade enzimática da NAD-glutamato desidrogenase foi monitorada como descrito por Doherty (1970), salvo algumas modificações. A 1 mL de tampão contendo fosfato de potássio 0,1 M, pH 7, NH_4Cl 50,5 mM e NADH 0,12 mg/mL foram adicionados 10 μg a 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de proteína e a reação se deu início pela adição de α -cetoglutarato 3 mM. O coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{(340)}$ NADH) utilizado nos cálculos de atividade específica foi $6,22 \cdot 10^6 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$ e o caminho óptico da cubeta foi de 1 cm. A atividade da NADP-glutamato desidrogenase foi monitorada da mesma maneira que a atividade de NAD-glutamato desidrogenase, exceto pela adição de NADPH ao invés de NADH e a solução de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,8.

4 Resultados e Discussão

4.1. Restrição calórica e tempo de vida cronológico:

Lin *et al.* (2000) e Jiang *et al.* (2000) mostraram que a restrição calórica em leveduras, caracterizada pela diminuição de glicose no meio rico (YPD) de 2,0% (111,0 mM) para 0,5% (27,8 mM), leva a um aumento do tempo de vida replicativo de leveduras. Barros *et al.* (2004) mostram que a diminuição de glicose no meio rico leva também a um aumento do tempo de vida cronológico em *S. cerevisiae*, monitorado através da utilização do sonda FUN 1[®].

Fig. 8 – Tempo de vida cronológico de células selvagens BY4741. A viabilidade de células crescidas em cultura por 4 (A) ou 12 dias (B) em 2% ou 0,5% de glicose foi avaliada em células da linhagem BY4741 através da utilização de FUN 1[®] para avaliar a integridade metabólica ou através da capacidade reprodutiva das células cultivadas por 12 dias (C). $p < 0.05$ em relação a 2,0% glicose.

Com a finalidade de estudar os efeitos da diminuição de glicose sobre o tempo de vida cronológico, a integridade metabólica de *S. cerevisiae* linhagem BY4741 selvagem foi acompanhada através do fluoróforo FUN 1[®]. Além disso nós também avaliamos a viabilidade das leveduras através da capacidade das células em formar colônias, uma forma de integridade reprodutiva (fig. 8). A

diminuição de glicose no meio de cultura leva a um aumento da integridade metabólica das células tanto em 4 quanto em 12 dias em cultura. Células crescidas por 12 dias em meio líquido YPD com 0,5% de glicose apresentaram um aumento da viabilidade quando comparadas as células em controle (2,0%) glicose.

Juntos esses dados mostram que a RC leva a um aumento do tempo de vida cronológico que pode ser mensurado através da viabilidade metabólica, através do metabolismo de FUN 1[®] e através da contagem do número de colônias.

4.2 Efeitos da restrição calórica sobre processos metabólicos e redox que afetam a longevidade.

Nós estudamos o papel da RC sobre a longevidade de células que apresentam alterações do metabolismo redox que levam a disfunções mitocondriais em *S. cerevisiae*. Avaliamos o papel da RC em duas linhagens distintas: EG118, deficientes em Sod1p, e que expressam a SOD1 humana selvagem (hWT) e com mutações G93A e A4V nessa enzima.

Monitoramos a integridade metabólica em fase estacionária através da diferença de fluorescência FUN 1[®] (**fig. 9**) em células deletadas para a SOD1 de leveduras e que hiperexpressaram a SOD humana selvagem (hSOD) e com mutações pontuais relacionadas a fELA, G93A, com mutação na interface do dímero e A4V, mutação no sítio ativo da enzima. As leveduras foram crescidas em meio YPD 2% (controle) ou em 0,5% (RC) por 4 e 12 dias.

Apesar do aumento significativo da metabolização do FUN 1[®] em leveduras crescidas em RC, nós não encontramos diferenças significativas entre a *wild-type* (WT), que superexpressa a CuZnSOD humana normal e as mutantes.

O tempo de vida cronológico dessas mutantes também foi avaliado através da integridade reprodutiva, ou habilidade de formar colônias quando colocadas em meio sólido (**fig. 9C**). Nós não encontramos diferenças significativas entre WT e mutantes em condições de crescimento controle. Em RC, a mutante A4V, mutação que leva a uma mudança de resíduo de aminoácido no sítio ativo da enzima apresenta capacidade reprodutiva

diminuída. A RC é capaz de aumentar o tempo de vida cronológico na mutante G93A, mas não em A4V.

Fig. 9 – Tempo de vida cronológico de mutantes de SOD. A viabilidade de células crescidas em cultura por 4 (A) ou 12 dias (B) em 2% ou 5% de glicose foi avaliada em mutantes que expressam SOD humana através da utilização de FUN 1[®] para avaliar a integridade metabólica. Leveduras cultivadas por 12 dias foram plaqueadas em um total de 100 células (C). A formação final de colônias foi contada após 30 h. *p < 0,5% em relação à *wild-type* (WT).

Fizemos um *Western blot* para nos certificarmos que os resultados obtidos não foram pela perda da proteína em nosso protocolo de crescimento. Os níveis de expressão das SOD estão presentes e em maior quantidade do que as que cresceram no meio quimicamente definido sem lisina, marca gênica (fig. 5). Esse resultado corrobora com a ideia de que apenas a superexpressão dessa proteína não é suficiente para alterar a longevidade de *S. cerevisiae*.

Como um segundo modelo em que o tempo de vida cronológico é afetado por problemas no metabolismo, estudamos mutantes nulas para o gene *NPT1*, que codifica nicotidamina fosforil transferase, necessária na reciclagem de NAD⁺ a partir da nicotidamina.

A RC aumenta a respiração mitocondrial e a relação NAD⁺/NADH, associada com aumentos de vida replicativo devido a ativação de Sir2p (Jiang *et al.*, 2000). Dessa maneira, mutações que comprometem a disponibilidade de NAD⁺ levariam à diminuição da longevidade. Barros *et al.* (2004) mostraram que a RC é capaz de aumentar o tempo de vida cronológico da mutante *sir2Δ*.

A *npt1Δ* apresenta diminuição da respiração mitocondrial, aumento da produção de EROs e diminuição do tempo de vida cronológico (Tahara *et al.*,

2007) (**fig. 10**). Curiosamente, a RC foi capaz de aumentar o tempo de vida cronológico nas mutantes *npt1Δ*.

Fig. 10 – Tempo de vida cronológico em levedura que apresenta defeito na via de síntese de NAD. Leveduras cultivadas por 4 dias foram plaqueadas em um total de 100 células. A formação final de colônias foi contada após 30 h. *p < 0.05 em relação ao controle, #p < 0.05 em relação à WT

4.3 Papel mitocondrial sobre a longevidade de *S. cerevisiae*

4.3.1. Diidrolipoil desidrogenase: envolvimento na longevidade e produção de EROs em *S. cerevisiae*.

A RC aumenta a razão NAD^+/NADH , um efeito determinante na longevidade replicativa e associado a um aumento do consumo de O_2 . Por outro lado, a longevidade cronológica está associada ao balanço redox do tecido, e é diminuída por estresse oxidativo. Realmente, experimentos do nosso grupo indicam que esses mutantes geram quantidades aumentadas de EROs mitocondriais (Tahara *et al.*, 2007). No entanto, o motivo pelo qual mutantes de vias de síntese de NAD^+ apresentam maior geração de EROs mitocondriais é pouco óbvio, já que nessas mitocôndrias menos elétrons irão entrar na cadeia respiratória. Pensamos então que poderia haver vazamento de elétrons anterior à cadeia respiratória destas mitocôndrias.

Trabalhos de Massey (revisado em Massey, 1994) mostram que enzimas que possuem como constituintes flavinas como FAD e FMN podem levar a produção de radical superóxido (O_2^-). Outros trabalhos recentes

utilizaram tecido de mamíferos e mostraram que a diidrolipoil desidrogenase (presente na piruvato e α -cetoglutarato desidrogenases) pode também gerar EROs em uma maneira dependente da disponibilidade de NAD^+ (Starkov *et al.*, 2004; Tretter & Adam-Vizi, 2004). A mutante *lpd1 Δ* não apresenta atividade de diidrolipoil desidrogenase (Dickinson *et al.*, 1986). Para avaliarmos a importância da NAD^+/NADH no metabolismo redox e investigar se as desidrogenases eram fontes de EROs também em leveduras, nós comparamos a geração de EROs em mitocôndrias WT e *lpd1 Δ* utilizando diferentes substratos (fig. 11)

Fig. 11 – Participação da piruvato e da α -cetoglutarato desidrogenases como fontes de EROs mitocondriais. Mitocôndrias permeabilizadas com alameticina 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução contendo mitocôndrias foram adicionadas ao meio de reação a 30°C contendo sorbitol 0,6 M, KPi 32,5 mM, Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 7,5 e 100 mM de coenzima A). A geração de H_2O_2 foi monitorada como descrito em Materiais e Métodos. piruvato (Pyr), α -cetoglutarato (α -kG), succinato (Succ) e malato (Mal) foram adicionados onde indicado, 5 mM. O Painei A mostra os traçados típicos, enquanto o Painei B mostra médias. * $p < 0.01$ em relação ao traçado sem substratos, # $p < 0.001$ em relação a WT.

Em mitocôndrias intactas, o espaço limitado da matriz mitocondrial permite o acúmulo de produtos da reação enzimática, que agem como substratos de outras enzimas. Dessa maneira a contribuição de cada reação na produção de EROs não pode ser determinada. Para contornar essa situação,

nós monitoramos a geração de EROs em mitocôndrias em que as membranas foram permeabilizadas pela alameticina, que produz poros na membrana de maneira a permitir a passagem de substratos, mas não permite a passagem de enzimas. O uso de diferentes substratos nessa situação permite avaliar a liberação de EROs pelas fontes mitocondriais individualmente.

A formação de EROs é estimulada pela adição de α -cetoglutarato e piruvato em mitocôndrias WT, mas não em *lpd1Δ*, indicando que as enzimas do complexo diidrolipoil desidrogenase, α -cetoglutarato e piruvato contribuem substancialmente para a formação de EROs em células WT. Ao contrário do malato, a adição de succinato levou a um grande detecção de peróxido de hidrogênio. Essa detecção pode ser relacionada a presença de grupamentos FMN na succinato desidrogenase que pode, na presença de luz, gerar superóxido (revisado em Massey 1994), ou à geração de EROs em pontos posteriores da cadeia respiratória (Tahara *et al.*, 2009). Nossos resultados indicam que EROs podem ser geradas em quantidades significativas em mitocôndrias por fontes diferentes da cadeia de transporte de elétrons. A constatação de que estas fontes contribuem para o envelhecimento de *S. cerevisiae* (Tahara *et al.*, 2007) traz maior relevância a esse achado (**fig. 12**).

Fig. 12 – Proposta do controle da geração mitocondrial de EROs pela RC. O vazamento de elétrons leva à geração de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que podem ser originados a partir da cadeia respiratória ou dos complexos multienzimáticos da piruvato (PDH) e α -cetoglutarato (α -KGDH) desidrogenase. Essa geração pode ser prevenida leveduras pelo aumento no transporte de elétrons promovido por RC ou desacopladores como o dinitrofenol (DNP). A geração de EROs em PDH e α -CDH é aumentada pela diminuição da taxa respiratória, que leva a diminuição da razão $NAD^+/NADH$ e em mutações da via de síntese e recuperação de NAD^+ (*NPT1*, *BNA6* e *PNC1*). A ausência da diidrolipoil desidrogenase (*Lpd1p*) previne a geração de EROs por essa enzima. O acúmulo de EROs leva a oxidação mitocondrial e citoplasmática de glutatona ($GSH \rightarrow GSSG$) e limita o tempo de vida em *S. cerevisiae*.

4.3.2 Respiração mitocondrial versus fermentação

A repressão catabólica ocorre quando a concentração de glicose, ou a de um dos produtos iniciais do metabolismo da glicose, reprime a síntese de várias das enzimas respiratórias e gliconeogênicas (Fiechter *et al.*, 1981). Nós observamos que a baixa concentração de glicose (0,2% e 0,5%) em meio rico leva ao aumento do número de colônias ou da viabilidade reprodutiva quando comparadas a maiores concentrações de glicose (1,0 – 3,0%). Para estudarmos se essa diferença de viabilidade em *S. cerevisiae* é devido ao efeito de repressão de glicose à respiração, nós realizamos um estudo sobre a restrição de outras fontes de carbono sobre a longevidade. Utilizamos glicose, galactose, rafinose e glicerol/etanol.

Fig. 13 – Utilização de fontes de carbono por *S. cerevisiae*. A galactose é transportada para o interior da célula graças à ação de permeases específicas. Dentro da célula, a galactose, na via de Leloir, é convertida a glicose 6-fosfato, um dos intermediários da via glicolítica. A rafinose, graças a ação de invertases, localizadas no espaço extracelular, é convertida a frutose e melibiose, que então entram na célula. A melibiose é convertida a galactose e glicose graças à ação de α -galactosidase. A glicose, galactose e rafinose são fontes de carbono fermentáveis, além de gerarem substratos para a cadeia de transporte de elétrons. Um transportador simporter transloca glicerol e prótons para o interior da mitocôndria (Ferreira *et al.*, 2005), onde é convertido a glicerol 3-fosfato, substrato da glicerol 3-fosfato desidrogenase (Gut2p), localizada na membrana interna, voltado para o espaço intermembranas, que é capaz de entregar elétrons diretamente para a cadeia de transporte de elétrons através da coenzima Q.

S. cerevisiae utiliza preferencialmente glicose ao invés de outros açúcares como a galactose. A galactose é utilizada por *S. cerevisiae*, assim como pela maioria dos outros organismos, pela sua conversão a glicose-6-fosfato catalisada pelas enzimas da via de Leloir (Leloir, 1951), cujos genes são susceptíveis à repressão por glicose (**fig. 13**).

Fig. 14 – Restrição de glicose, mas não galactose, rafinose ou glicerol/etanol, aumenta o tempo de vida cronológico (habilidade de formar colônias) em *S. cerevisiae*. 100 células em fase estacionária tardia cultivadas em meio rico líquido contendo glicose, galactose, rafinose ou glicerol mais etanol (onde indicado) como substratos forma plaqueadas em meio sólido YPD 2,0%. As colonias foram contadas após 36 h de crescimento a 30°C. *p < 0.05 versus 3.0%.

Curiosamente, o aumento da concentração de glicerol/etanol, galactose e rafinose (**fig. 14**) não levou a diminuição do tempo de vida cronológico e em baixas concentrações de rafinose (0,2-1,0%) nós observamos uma diminuição da viabilidade celular. A rafinose é um trissacarídeo e sua utilização depende

da ação de invertases não específicas e tem como produto melibiose e frutose, sua utilização depende, portanto, da cinética de conversão nesses dois produtos.

A fim de testarmos se a repressão da respiração por glicose não estava afetando somente a capacidade reprodutiva por decrescer a habilidade replicativa da célula, nós monitoramos a viabilidade através da integridade metabólica da célula através do acúmulo da calceína que acumula e fluoresce apenas nas células metabolicamente ativas (**fig. 15**). A análise do histograma da fluorescência, monitorada através de citometria de fluxo mostra que a restrição de glicose e de maneira mais branda, galactose, mas não rafinose ou glicerol/etanol leva a um aumento da fluorescência da calceína e dessa forma da integridade metabólica de *S. cerevisiae*. Juntos esses resultados apontam que a mudança do metabolismo fermentativo para a respiração é necessária para os efeitos benéficos observados na RC em *S. cerevisiae*, célula susceptível ao efeito Crabtree.

Fig. 15 – Restrição de glicose, mas não galactose, rafinose ou glicerol/etanol aumenta o tempo de vida cronológico (integridade metabólica) em *S. cerevisiae*. Retenção de calceína em células após 64 horas em cultura cultivadas em 0,2% (linhas pretas) ou 3,0% (linhas cinzas) de glicose, galactose, rafinose ou glicerol mais etanol foi monitorada como descrito em Materiais e Métodos.

Se os efeitos da repressão por glicose são realmente importantes nos efeitos da restrição calórica, e portanto importantes na longevidade no modelo de RC em leveduras, eles devem ser observados apenas em leveduras Crabtree-positivas. Dessa forma nós resolvemos testar se *Kluyveromyces lactis*, levedura Crabtree negativa, responde à diminuição de glicose no meio de cultura como *S. cerevisiae*.

No intuito de entender os mecanismos de longevidade relacionados à diminuição da disponibilidade da fonte de carbono e repressão por glicose, estudamos as diferenças de *S. cerevisiae* e *K. lactis* crescidas em meio YPD 0,5% e 2,0% de glicose por 16 horas e 64 horas através da análise qualitativa das bandas α de absorção correspondente aos citocromos *c*, *c*₁, *b*, *b*₁ e *a*₃ (fig. 16).

Fig. 16 - Espectro mitocondrial. Mitocôndrias foram preparadas a partir de *K. lactis* e *S. cerevisiae*. As duas linhagens foram crescidas em meio YPD 0,5% e 2,0% por 16 e 64 horas. As mitocôndrias foram extraídas a concentração final de 8 mg/mL como descrito em Materiais e Métodos. As bandas α de absorção *c*, *c*₁, *b*, *a*, *a*₃ estão indicadas na figura.

Nós também monitoramos a atividade da NADH citocromo *c* redutase e da citocromo *c* oxidase em *S. cerevisiae* e *K. lactis* (fig. 17). *K. lactis*, Crabtree negativa e respiratória preferencial, apresenta uma maior banda de α absorção

de citocromos (**fig. 16**), e maior atividade da NADH-citocromo c redutase e de citocromo c oxidase (**fig. 17**) quando comparada a *S. cerevisiae*. Quando submetidas à RC *S. cerevisiae*, apesar de não apresentar um aumento da quantidade de citocromos, apresenta um aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons evidenciada pelo aumento da atividade da NADH-citocromo c redutase e da citocromo c oxidase, o que concorda com os resultados encontrados por nosso grupo de maior eficiência respiratória associada aos efeitos de desrepressão.

Fig. 17 – Atividade mitocondrial de NADH – citocromo c redutase e citocromo c oxidase. A atividade da NADH-citocromo c redutase e da citocromo c oxidase foi monitorada em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* e em *K. lactis* a temperatura ambiente, como descrito em Materiais e Métodos. * $p < 0,05$ em relação a 2,0%.

A quantidade de citocromos observada através dos espectros mitocondriais de *S. cerevisiae* (linhagem BY4741) pode ser explicada pela diminuição da expressão do gene *HAP4*, característica dessa linhagem, levando a redução dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e um aumento da resposta a restrição de glicose (Lin *et al.*, 2002). A diminuição das bandas espectrais em 0,5% de glicose em *K. lactis* corrobora com nossos

resultados que mostram que a diminuição do tempo de vida cronológico em *K. lactis* está provavelmente associada à perda da viabilidade mitocondrial (fig. 18).

Fig. 18 – *K. lactis* não apresenta aumento do tempo de vida cronológico com a restrição de glicose.

À esquerda, a habilidade de formar colônias foi medida por plaqueamento em meio sólido de 100 células cultivadas de 0,2 a 3,0% de glicose por 64 horas. As colônias foram contadas após 36 horas de crescimento a 30 C. *p<0.05 versus 3.0% glicose. à direita, a integridade metabólica foi monitorada pela retenção de calceína em células cultivadas em 0,2% (linhas pretas) ou em 3,0% (linhas cinzas) de glicose.

A diminuição de glicose no meio de cultura de *K. lactis* levou a uma drástica diminuição da viabilidade dessas células, observada tanto pela diminuição do número de colônias, quanto pela diminuição da integridade metabólica.

Dessa maneira os efeitos benéficos associados a RC em *S. cerevisiae* estão associados a uma diminuição da glicose, mas não de outras fontes de carbono. A mudança do metabolismo fermentativo para oxidativo parece estar envolvido nesse processo.

4.4 Envelhecimento e proteoma mitocondrial

No laboratório do Prof. Francis Sluse, Bélgica, nós iniciamos o estudo da RC sobre o proteoma mitocondrial em leveduras visando compreender melhor a participação dessa organela no envelhecimento.

Mitocôndrias de leveduras BY4741 crescidas em duas concentrações distintas de glicose, 2,0% (controle) e 0,5% (RC) por 16 horas e 64 horas foram utilizadas. A **fig. 19** mostra o fluxograma dos passos utilizados desde a obtenção das amostras de mitocôndrias até a obtenção dos resultados da análise por MALDI/TOF.

Com a finalidade de nos certificarmos de que as proteínas mitocondriais não sofreram nenhuma proteólise durante os processos de extração, desnaturação e *clean-up*, comprometendo dessa maneira a análise peptídica, submetemos todas as amostras a gel eletroforético NuPAGE® antes de proceder com o gel de primeira dimensão, descartando quaisquer amostras com proteólise. A **fig. 20** mostra um exemplo do gel NuPAGE® para as amostras de 0,5% e 2,0% 64 horas.

Fig. 19 – Proteoma mitocondrial. Fluxograma das atividades realizadas para obtenção do proteoma mitocondrial de *S. cerevisiae* submetidas a RC por 16 e 64 horas, descrito em Materiais e Métodos.

Fig. 20 – Gel NuPAGE da amostra de proteína mitocondrial. 25 μ g de proteínas mitocondrias foram utilizadas para a análise da qualidade proteica como descrito em Materiais e Métodos.

Prosseguimos com gel 2D-DIGE para a análise quantitativa comparativa dos mitoproteomas entre as condições RC 16 horas, controle 16 horas, RC 64 horas e controle 64 horas. Todas as condições foram repetidas em triplicatas num total de 12 amostras. A técnica de *DIGE* permite a comparação entre as condições pela adição de diferentes sondas (Cy2, Cy3 e Cy5). Nessa técnica, um mesmo gel pode conter até duas diferentes amostras e o padrão interno possibilitando a comparação entre diferentes géis, portanto 6 géis foram necessários para as 12 diferentes amostras.

As condições analisadas foram 0,5% glicose 64 horas vs 16 horas, 2,0% de glicose 64 horas vs 16 horas, 0,5% glicose 64 horas vs 2,0% de glicose 64 horas e 0,5% de glicose 16 horas vs 2,0% de glicose 16 horas. Através da análise de variação biológica do programa Decyder[®] e do valor do Student's test < 0,05 foram selecionadas 240 manchas. A análise por MALDI/TOF identificou 173 dessas manchas (74 proteínas), das quais 120 (50 proteínas) têm um alto score (**Material Suplementar**).

Em primeira análise, as manchas foram separados de acordo com a função proteica na tentativa de compreender a participação da RC sobre a função celular e os mecanismos pelos quais a RC leva a um aumento da longevidade.

Fig. 21 – Géis com sondas diferenciais e mapa de referência de amostra de padrão interno. Mitocôndrias RC e controle foram isoladas e extraídas como descrito em Materiais e Métodos. Diferentes sondas CyDyes, Cy3 – 0,5% glicose, 64 horas (A), Cy5 – 2,0% glicose, 64 horas (B), Cy2 - padrão (C). D representa a sobreposição de fluorescência de todas as sondas.

A distribuição segundo a função das manchas identificadas (**fig. 22A**) e proteínas (**fig. 22B**) estão representadas abaixo. Algumas das proteínas foram identificadas em mais de uma das manchas, indicando modificação da proteína. A baixa significância observada em alguns dos resultados obtidos na comparação dos géis através do Decyder[®] se deve ao fato de que inicialmente apenas os *matchings* dos padrões internos terem sido verificados. Acreditamos

que retorno e comparação entre todas as condições e sondas devem ser realizados para se certificar da qualidade de *matching* entre todas as amostras.

Nós optamos por separar as proteínas ligadas à diidrolipoil desidrogenase em um mesmo grupo ao invés de colocamos no grupo do ciclo do ácido cítrico ou de metabolismo, como a piruvato desidrogenase.

O **complexo da piruvato desidrogenase** constitui-se de 3 subunidades, piruvato desidrogenase (E1), diidrolipoil transacetilase (E2) e diidrolipoil desidrogenase (E3). Em recente trabalho nós mostramos que a subunidade E3 tem papel importante nos efeitos benéficos encontrados na RC (Tahara *et al.*, 2007). Em mamíferos e leveduras, o complexo da piruvato desidrogenase contém outros complexos conjugados, α -cetoglutarato desidrogenase e α -cetoácido desidrogenase de aminoácidos de cadeia ramificada (via catabólica). Todos partilham a mesma subunidade E3. A análise do proteoma mitocondrial mostrou uma mudança no volume das manchas referentes às subunidades do complexo da piruvato desidrogenase. Nela a **piruvato desidrogenase (E1)** aparece diminuída no controle em 64 horas quando comparada a 16 horas (~0,6 vezes), ou seja, há uma diminuição dessa enzima com o tempo. A **diidrolipoil transacetilase (E2)** também aparece diminuída nessa condição (~0,5 vezes). A mesma enzima aparece aumentada quando comparada com RC 64 horas/controle 64 horas (1,34 vezes). A **diidrolipoil desidrogenase (E3)** em RC com o tempo aparece aumentada em até 3,25 vezes e também está presente em aumento quando comparada em RC vs controle nas diversas condições. A rota biossintética de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) também é alterada em RC. A enzima **ceto acido reductoisomerase (Iv5p)**, que gera $\alpha\beta$ -diidroxiisovalerato a partir de α -cetolactato, decresce com o tempo tanto em RC quanto controle. A conversão de 2,3 diidroxi isovalerato a ceto-isovalerato é catalisada pela enzima **diidroxi ácido deidratase (Ilv3p)**. O ceto-isovalerato pode ser convertido a α -isopropilmalato pela **isopropilmalato sintase (Leu1p)** às custas de acetil CoA ou em valina pelo **aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (Bca1p)**. A isopropil malato é exportada ao citosol onde é transformada em lisina. Quatro manchas foram identificados como Ilv3p. Apesar de Ilv3p diminuir com o tempo em todas as condições (RC 64H/16H,

~0,4; e controle 64H/16H, ~0,5), a RC leva a uma diminuição de *Ilv3p* tanto em 16 horas quanto em 64 horas (quando comparada ao controle). Há uma grande diminuição de aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada com o tempo (RC 64H/16H ~0,3, controle 64H/16H 0,47). Esse decréscimo é mais acentuado em RC tanto em 16 horas (RC / controle 16H, ~0,79) quanto nas células submetidas a RC por 64 horas (RC/controle 64H, ~0,52).

O isopropil malato é de grande importância no metabolismo de nitrogênio em leveduras (Mathy *et al.*, 2006). Funciona como ativador da *Leu3p*, fator de transcrição que controla a expressão de diversos *target genes* como *ILV3*, *ILV5* e *BCA1*, essenciais para o metabolismo de nitrogênio. Apesar da variação apontar para um decréscimo da α -isopropil malato sintase, os valores não são significativos. Juntos, esses resultados sugerem que RC pode levar a uma diminuição do metabolismo de nitrogênio.

Na comparação entre os géis de 2D-DIGE encontramos variação de 5 enzimas do **ciclo de Krebs**, excluindo-se as do complexo da piruvato desidrogenase. A **citrato sintase**, enzima que participa da formação de citrato a partir de acetil CoA e oxaloacetato, foi identificada em 4 manchas. Ela possui sua quantidade aumentada em RC tanto em 16 horas quanto em 64 horas (RC/controle 16H 1,62 em média; RC/controle 64H ~1,67 em média). A **aconitase hidratase**, responsável pela catálise na formação de aconitase a partir de citrato tem sua quantidade diminuída em relação ao tempo e em RC 64 horas. A aconitase é uma enzima sensível a resposta ao estresse oxidativo devido a presença de centros Fe-S. A presença de 5 manchas identificadas para essa enzima sugere modificações pós transducionais e/ou diferenças relacionadas ao ataque de EROs ao seu centro de Fe-S. A diminuição dessa enzima poderia também estar associada à sinalização da disponibilidade de glicose levando a um acúmulo de citrato, que um efector negativo da glicólise.

Fig. 22 – Características das proteínas moduladas no envelhecimento e em RC. As proteínas identificadas que possuem variação estatística significantes foram organizadas de acordo com sua função. O gráfico representa a % das manchas identificados por função (A) ou % de proteínas identificadas em cada função (B). Foram expressos nos gráficos apenas as manchas identificados com alto score de identificação.

A **isocitrato desidrogenase dependente de NADP** tem sua quantidade diminuída com o tempo tanto em RC quanto controle e em RC em 16 e 64 horas quando comparada com o controle. É sabido que os efeitos benéficos da RC estão associados a um aumento da disponibilidade de NAD (Lin *et al.*, 2004). A **isocitrato desidrogenase dependente de NAD** tem sua quantidade diminuída com o tempo, no entanto quando submetidas à RC, a análise do mitoproteoma indicou um aumento tanto em 16 horas (~1,3 em média) quanto em 64 horas (~1,6 em média) quando comparadas ao controle nos mesmos tempos.

Enzimas da cadeia de transporte de elétrons, **succinato desidrogenase** (complexo II) e **ubiquinol-citocromo c redutase** (complexo III), aparecem aumentadas em RC vs controle tanto em 16 horas quanto em 64 horas, indicando um aumento dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em RC.

Curiosamente os níveis de uma das enzimas envolvidas na síntese de grupo heme, a **ferroquelatase (HEMH)** decrescem em culturas em 64 horas em ambas as condições e em RC vs controle em 16 horas há um decréscimo da quantidade dessa enzima, indicando a ativação de via de reciclagem do grupamento.

Várias subunidades da ATP sintase aumentam em RC tanto em 16 horas quanto em 64 horas. Juntos, o aumento das enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico, complexo II e III da cadeia de transporte de elétrons e ATP sintase sugerem que a RC leva a um maior fluxo metabólico.

Ao avaliarmos as diferenças quanto à variação de enzimas associadas ao estado redox, nós nos deparamos com um aumento da **peroxirredoxina mitocondrial** em RC/controle em 16 horas (1,46 vezes, $p = 0,0026$).

Em nossa análise, as enzimas relacionadas à estabilidade do DNA mitocondrial como a **Mmf1p** e também de reparo do DNA mitocondrial **DNA repair protein Rad59p** diminuem tanto em RC quanto em controle em 64 horas.

Algumas das enzimas identificadas em nosso análise por 2D-DIGE são de origem citosólica. A **gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)** é uma importante enzima da via glicolítica. Recentemente a GAPDH tem sido evidenciada como uma proteína de múltiplas funções, em particular seu papel como mediadora da morte celular (Almeida *et al.*, 2007). Em mamíferos, quando ligada ao receptor inositol 1,4,5-trifosfato, essa enzima seria capaz de modular o fluxo de cálcio de maneira dependente da disponibilidade de cálcio (Patterson *et al.*, 2005). Quando da perda da viabilidade celular, essa enzima estaria envolvida em rotas apoptóticas, aumentando a permeabilidade mitocondrial. GAPDH também estaria presente no núcleo, onde participaria da transcrição, replicação de DNA, reparo e exportação de RNA. Ela também estaria associada a telômeros, promovendo a estabilidade e funcionalidade. GAPDH tem sido associada a patologias e morte celular quando marcada com

óxido nítrico. Essa ligação afetaria as interações proteína-proteína da GADPH, atribuindo a essa enzima um ganho de toxicidade (Matsumoto *et al.*, 2003). Além disso, GADPH funcionaria como um sensor de óxido nítrico (revisto em Hara *et al.*, 2006). Identificamos 3 manchas como GADPH. Em RC há um aumento dessa enzima em 64 horas em 1,73 vezes, enquanto em controle 64 horas há uma diminuição dessa enzima em até aproximadamente 0,53 vezes. Quando comparadas às condições de disponibilidade de glicose em RC, notamos um aumento dessa enzima em até 1,9 vezes em RC vs controle 64 horas. Curiosamente, em 16 horas os níveis dessa enzima em RC estão diminuídos vs controle.

Os dados obtidos da análise das proteínas mudadas em RC em 16 horas e 64 horas mostram diferenças quanto às enzimas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico, malato desidrogenase, fumarato hidratase, isocitrato desidrogenase, aconitase hidratase e citrato sintase. *S. cerevisiae* crescidas em RC apresentam um aumento significativo da fumarato hidratase em 1,8 vezes se comparado ao controle após 16 horas de crescimento quando avaliado seu proteoma mitocondrial. Nós avaliamos a correlação entre a quantidade da proteína e sua atividade monitorada em mitocôndrias de *S. cerevisiae* após 16 e 64 horas de crescimento em controle e RC. A RC leva a um aumento da atividade da fumarato hidratase em 16 horas em aproximadamente 2 vezes se comparada com o controle (**fig. 23A e 23B**).

Fig. 23 - Atividade mitocondrial da fumarato hidratase. A atividade da fumarato hidratase foi monitorada em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* a 25°C, como descrito em materiais e métodos. Em (A) traçado típico e em (B) as médias da atividade específica da fumarase. * $p < 0,05$ em relação a 0,5% WT em cada uma das condições. $N \geq 8$ em cada uma das condições.

Goldberg *et al.* (2009), em estudo sobre o efeito da RC sobre tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae*, mostraram que a além de uma remodelagem no metabolismo de trealose e glicogênio e aumentos do consumo de lipídeos neutros, a RC leva a mudanças na quantidade relativa de proteínas em relação a 2,0% de glicose. Aumentos da quantidade relativa de proteínas relacionados com o complexo multienzimático da piruvato desidrogenase, ciclo do ácido cítrico, cadeia de transporte de elétrons, assim como as relacionadas com a síntese e ligação do grupamento heme foram observados entre as proteínas identificadas, tanto no lisado total de células, quanto em mitocôndrias isoladas, corroborando com nossos resultados em proteoma mitocondrial.

4.5 Efeito do metabolismo de aminoácidos e da restrição calórica sobre a longevidade.

Jiang *et al.* (2000) mostraram que a diminuição de aminoácidos no meio de cultura leva a um aumento do tempo de vida replicativo em *S. cerevisiae* de maneira semelhante ao encontrado pela diminuição de glicose. A diminuição de nutrientes, especialmente aminoácidos, é capaz de regular a via de sinalização de TOR, ligada ao ciclo celular, tempo de vida replicativo e cronológico (revisado em Barros *et al.*, 2010).

Além de proteínas envolvidas com a cadeia de transporte de elétrons e ciclo do ácido cítrico, também as proteínas associadas ao destino de aminoácidos apresentam grandes modificações no perfil mitoproteômico em RC vs controle (**fig. 22**). Enzimas como a aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, treonina hidratase, serina hidroximetil transferase, assim como a enzima diidrolipoil desidrogenase apresentam variações nessas duas condições de cultivo, 2,0% e 0,5% de glicose.

Com a finalidade de avaliarmos a participação da concentração de aminoácidos sobre o tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae*, nós monitoramos a habilidade de formar colônias de células cultivadas em meio rico (YPD) e em meio quimicamente definido sem sulfato de amônio (MD-AS) na presença de 2,0% ou 0,5% de glicose após 16 horas e 64 horas de crescimento sob agitação constante (**fig. 24**).

Mesmo em presença de 2,0% de glicose, as células crescidas em meio MD-AS apresentam uma maior longevidade, se comparada com as células que cresceram YPD. O meio de cultura MD-AS apresenta menor concentração de aminoácidos quando comparado ao meio YPD (**tabela 1**), indicando que o metabolismo de aminoácidos tem um papel importante sobre o tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae*.

Tabela 1 – Concentração de aminoácidos e uracila e adenina adicionados ao meio de cultura sintético e contidos no extrato de levedura da BD®.

Nutriente	Concentração final no meio de cultura (µg.mL ⁻¹)	
	Meio quimicamente definido	Extrato de levedura
ácido aspártico	100	530
ácido glutâmico	100	940
Adenina	40	n.d
Alanina	-	560
Arginina	20	260
Cisteína	-	20
Fenilalanina	50	260
Glicina	-	300
Histidina	20	130
Leucina	60	410
Lisina	30	460
Metionina	20	80
Prolina	-	200
Serina	375	160
Tirosina	30	120
Treonina	200	160
Triptofano	40	50
Uracila	20	n.d
Valina	150	350

Fig. 24 - A diminuição de aminoácidos no meio de cultura abole os efeitos da RC sobre o tempo de vida cronológico. A habilidade de formar colônias foi medida por plaqueamento em meio sólido de 100 células cultivadas em meio YPD ou meio quimicamente definido sem sulfato de amônio (MD-AS) na presença de 0,5 ou 2,0% de glicose por 16 e 64 horas. As colônias foram contadas após 36 horas de crescimento a 30°C. * $p < 0.05$ versus 2,0% glicose

Além de uma maior quantidade de aminoácidos presentes, o extrato de levedura também apresenta uma maior quantidade de cofatores e vitaminas. Nós nos certificamos de que o aumento da longevidade promovido pela crescimento de *S. cerevisiae* é atribuído à diminuição de aminoácidos no meio MD-AS através da análise do tempo de vida cronológico de células cultivadas em meio MD-AS suplementado com aminoácidos, de maneira a alcançarmos as concentrações presentes no extrato de levedura (**fig. 24**). Apesar da peptona também ser uma fonte de nitrogênio, nós não consideramos essa participação para a suplementação de aminoácidos.

O aumento da concentração de aminoácidos no meio de cultura MD-AS levou a uma diminuição da longevidade que pode ser parcialmente prevenida pela RC. Juntos, esses resultados indicam que a concentração e provavelmente o metabolismo de aminoácidos são importantes na longevidade de *S. cerevisiae*.

A utilização de amônia por *S. cerevisiae* ocorre por sua incorporação em glutamato e glutamina e pode ocorrer através de duas rotas metabólicas distintas, reguladas de maneiras diferentes. A assimilação de amônia por *S. cerevisiae* pode ser realizada tanto pela reação catalisada pela NADP-glutamato desidrogenase (NADP-GDH) quanto pelas enzimas glutamina sintetase (**reação 1**) e glutamato sintase (**reação 2**).

A NADP-GDH catalisa a assimilação de amônia e formação de glutamato (**reação 3**), enquanto a NAD-glutamato desidrogenase (NAD-GDH) catalisa a deaminação do glutamato, ou catabolismo de glutamato (**reação 4**).

Com a finalidade de estudarmos o envolvimento da RC no metabolismo de aminoácidos, nós acompanhamos as atividades da glutamato desidrogenase dependente de NAD^+ e de NADP^+ , enzimas chaves do metabolismo de aminoácidos, em amostras de extrato total de proteína de *S. cerevisiae*.

Nós encontramos diferenças significativas nas atividades da NAD-GDH em 64 horas e da NADP-GDH em 16 horas de células crescidas em condição controle e em RC (**fig. 25**). No entanto, nós não observamos diferenças nas atividade de NAD-GDH ou NADP-GDH em leveduras cultivadas em meio mínimo em presença de 0,5% e 2,0% de glicose.

Fig. 25 – Atividade da glutamato desidrogenase. A atividade da glutamato desidrogenase dependente de NAD^+ (painel à esquerda) e NADP^+ (painel à direita) foi monitorada em extrato total de proteínas de *S. cerevisiae* cultivadas por 16 horas ou 64 horas em meio YPD ou em meio quimicamente definido (MD-AS) na presença de 0,5% e 2,0% de glicose como descrito em Materiais e Métodos. * $p < 0,05$ em relação a 2,0% WT em cada uma das condições.

Não podemos atribuir a biossíntese de glutamato apenas à NADP-GDH, já que a incorporação de amônio produzindo glutamato é também realizada pela glutamina sintetase e glutamato sintase, **reações 1 e 2** respectivamente. Apesar disso, ao observarmos a razão entre as atividade de NAD-GDH e NADP-GDH, relação que nos dá informação parcial sobre a razão catabolismo/biossíntese de glutamato, podemos inferir o favorecimento do ciclo do ácido cítrico *versus* desvio para a rota biossintética de proteínas. A RC leva a um aumento da razão NAD GDH / NADP GDH em 16 horas e em 64 horas

quando comparado com as células cultivadas em glicose 2,0%. Curiosamente, em meio quimicamente definido, em que não há diferenças do tempo de vida cronológico quando as leveduras são crescidas em 2,0% ou 0,5% de glicose, nós não observamos diferenças na razão NAD GDH / NADP GDH entre RC e controle.

Fig. 26 – Relação entre as atividade da glutamato desidrogenase. A partir das atividade da glutamato desidrogenase dependente de NAD^+ e NADP^+ (figura 25) foi calculada a razão entre NAD glutamato desidrogenase e NADP glutamato desidrogenase de *S. cerevisiae* cultivadas por 16 horas ou 64 horas em meio YPD ou meio quimicamente definido (MD-AS) na presença de 0,5% e 2,0% de glicose.

A fim de testarmos o efeito de amônia, ou da repressão por nitrogênio, sobre a longevidade de *S. cerevisiae*, nós monitoramos o tempo de vida cronológico em leveduras crescidas por 16 horas em meio quimicamente definido, com ou sem suplementação de aminoácidos na presença de amônia.

Fig. 27 – Tempo de vida cronológico de células cultivadas em meio quimicamente definido por 16 horas. *S. cerevisiae* cultivadas por 16 horas em meio quimicamente definido controle ou suplementado com aminoácidos onde indicado e 2,0% e 0,5% de glicose, na presença ou na ausência de sulfato de amônio, em pH

A presença de sulfato de amônio em meio quimicamente definido sem suplementação no meio de cultura leva a uma diminuição do tempo de vida cronológico. Não há diferença estatística significativa entre o número de colônias em meio quimicamente definido suplementado com aminoácidos na ausência e na presença de sulfato de amônio nas mesmas concentrações de glicose.

Fig. 28 – Tempo de vida cronológico em leveduras que hiperexpressam GDH2. Leveduras WT e que hiperexpressam a NAD glutamato desidrogenase mitocondrial (TEF-GDH2) cultivadas por 16 ou 64 horas foram plaqueadas em um total de 100 células. A formação final de colônias foi contada após 30 h. * $p < 0.05$ em relação a 2,0% .

Nossos dados sugerem que a repressão por nitrogênio e o metabolismo de aminoácidos são chaves para os efeitos benéficos sobre a longevidade proporcionados pela restrição de glicose, e indicam uma possível participação da NAD-glutamato desidrogenase nos mecanismo de longevidade. No entanto, a hiperexpressão de Gdh2p (**fig. 28**) não levou a diferenças no tempo de vida cronológico quando comparada com a célula selvagem. Curiosamente em 64 horas nós não observamos aumento do tempo de vida cronológico em RC nas células que hiperexpressam a Gdh2p.

Miller e Magasanik (1990) mostraram que em leveduras nulas nos genes que codificam a proteína NADP glutamato desidrogenase, e que hiperexpressam *GDH2*, a assimilação de amônia a partir de α -cetoglutarato gerando glutamato se torna possível graças a Gdh2p, em um mecanismo compensatório. Além disso, a atividade da NADP e NAD glutamato desidrogenase estão sujeitas a regulação: o tipo de fonte de carbono e os níveis de glicose (Deluna *et al.*, 2001), assim como os de amônia no meio de cultura (Ter Schure *et al.*, 1995) são capazes de regular as atividades de Gdh1p, Gdh3p e Gdh2p. Dessa forma, a hiperexpressão pode não levar a aumentos da deaminação do glutamato (ou catabolismo do glutamato) e pode favorecer a via oposta, a biossíntese de glutamato.

Em *S. cerevisiae*, altas concentrações de glutamato levam a um aumento da expressão de *GDH2*, que codifica a NAD-glutamato desidrogenase, enquanto glutamina, amônia e ureia levam a uma diminuição. Uma segunda via de regulação da expressão da *GDH2* é a disponibilidade de fonte de carbono. Quando há baixa repressão a respiração, ou a fonte de carbono não é fermentável, a expressão de *GDH2* é aumentada (revisado em Hofman – Bang, 1999).

Nós suplementamos o meio quimicamente definido sem sulfato de amônio com glutamato (de 100 $\mu\text{g/mL}$ para 940 $\mu\text{g/mL}$) (**fig. 29**). Esse aumento de glutamato no meio mínimo não levou a mudanças no número de colônias em 2,0% e 0,5% de glicose, não alterando a viabilidade de *S. cerevisiae* mesmo quando cultivadas em RC.

Figura 29 – Tempo de vida cronológico de células cultivadas em meio quimicamente definido sem sulgato de amônio suplementado com glutamato. *S. cerevisiae* cultivadas por 16 ou 64 horas em meio MD-AS controle ou suplementado com glutamato na presença de 2,0% e 0,5% de glicose foram plaqueadas em um total de 100 células em meio sólido YPD 2%. A formação final de colônias foi contada após 30 h. n = 2 (16 horas), n = 3 (64 horas).

Nós monitoramos o tempo de vida cronológico de mutantes nulas em algumas transaminases, *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* e *gdh3Δ*, que codificam a aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada citosólica, a NADP glutamato desidrogenase citosólica, NAD glutamato desidrogenase mitocondrial e NADP glutamato desidrogenase, respectivamente (**fig. 30, painéis superiores**).

Apesar da RC não levar a um aumento da longevidade nas mutantes de aminotransferase aos níveis encontrados na selvagem em RC, aumentos significativos no tempo de vida cronológico foram encontrados em *bat2Δ* e *gdh1Δ* em relação a 2% de glicose da mesma mutante, mas não em Gdh2p e Gdh3p, indicando que a participação das proteínas mitocondriais são importantes para os efeitos benéficos da restrição calórica.

Fig. 30– Interação entre o sinal de glicose e o metabolismo de aminoácidos sobre a longevidade em *S. cerevisiae*. Mutantes de BY4741 *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* and *gdh3Δ*, que são nulas para as enzimas de transaminases de aminoácidos de cadeia ramificada citosólica, NADP glutamato desidrogenase citosólica, NAD-glutamato desidrogenase mitocondrial e NADP-glutamato desidrogenase mitocondrial, cultivadas por 64 horas foram plaqueadas em um total de 100 células em meio sólido YPD 2% (painéis superiores). A formação final de colônias foi contada após 30 h. * $p < 0.05$ em relação a WT 2,0%, ♦ $p < 0,05$ em relação ao mutante 2%. $N \geq 11$. A integridade metabólica (painéis inferiores) foi monitorada através da retenção de calceína em células em cultura em 0,5% de glicose, RC (linhas cinzas) e 2,0% de glicose (controle), como descrito em Materiais e Métodos.

Nós também monitoramos o tempo de vida cronológico de mutantes da via de metabolismo de aminoácidos através da viabilidade metabólica monitorada com calceína-AM (**fig. 30, painéis inferiores**). Em todos os mutantes, e principalmente em *bat2Δ*, a RC leva a uma diminuição da viabilidade metabólica se comparada a 2,0%.

Fig. 31 – Interação entre o sinal de glicose e o metabolismo de aminoácidos sobre a longevidade em *S. cerevisiae*. Mutantes de BY4741 *bat2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh2Δ* and *gdh3Δ*, que são nulas para as enzimas de transaminase de aminoácidos de cadeia ramificada citosólica, NADP glutamato desidrogenase citosólica, NAD glutamato desidrogenase mitocondrial e NADP glutamato desidrogenase mitocondrial, cultivadas por 16 horas foram plaqueadas em um total de 100 células em meio sólido YPD 2%. A formação final de colônias foi contada após 30 h. * $p < 0,05$ em relação a 2,0%, ** $p < 0,05$ em relação a WT 0,5%

Em 16 horas (**fig. 31**), a RC não leva a um aumento do número de colônias nas mutantes nulas em relação a 2,0%. Esses resultados sugerem que o metabolismo de aminoácidos, importante em 64 horas, quando a célula está em estado estacionário, também é importante nas primeiras horas de crescimento de *S. cerevisiae*. No entanto em 16 horas, tanto as enzimas citosólicas quanto as mitocondriais parecem desempenhar um papel importante

sobre o tempo de vida cronológico de *S. cerevisiae*.

5 Conclusões

- Leveduras contendo SOD com a mutação G93A, a mais comum em pacientes com fELA, não apresentam diminuição da viabilidade. A RC é capaz de aumentar o tempo de vida cronológico nessas células, com exceção a A4V, com mutação no sítio ativo da enzima;
- Mutantes nulas para proteínas envolvidas na síntese de NAD possuem integridade reprodutiva diminuída, de forma restaurada por RC, indicando que o aumento do tempo de vida cronológico está fortemente associado a níveis intracelulares de NAD. Encontramos que as enzimas contendo diidrolipoil desidrogenase contribuem substancialmente para a formação de EROs quando há falta de NAD^+ , levando ao envelhecimento destas células.
- Os efeitos benéficos sobre a longevidade no modelo de RC em *S. cerevisiae* estão associados à repressão por glicose e a mudança da fermentação para a respiração mitocondrial;

- A análise preliminar dos dados encontrados no estudo da proteômica mitocondrial frente a RC sugerem mudanças importantes em enzimas associadas a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada.
- Há um aumento de atividade de enzimas centrais no metabolismo de aminoácidos em células cultivadas e RC, indicando que o metabolismo de aminoácidos tem papel central nos efeitos benéficos encontrados na RC.
- O aumento de aminoácidos no meio de cultura, ou a adição de sulfato de amônio ao meio de cultura, leva a diminuição do tempo de vida cronológico que pode ser revertido por RC, indicando que o metabolismo de aminoácidos e a repressão por fonte de nitrogênio tem papel importante nos efeitos benéficos da RC sobre a longevidade de *S. cerevisiae*;
- Em nosso estudo com mutantes da via de aminoácidos, observamos aumento no tempo de vida cronológico em *bat2Δ* e em *gdh1Δ* devido a RC após 64 de crescimento em meio YPD, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada nas mutantes nulas para Gdh2p e Gdh3p, indicando que essas enzimas, mitocondriais, são importantes para os efeitos da RC.

6 Referências¹

Alban A, David S, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003 Jan;3(1):36-44.

Almeida B, Buttner S, Ohlmeier S, Silva A, Mesquita A, Sampaio-Marques B, et al. NO-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci*. 2007 Sep;120(Pt 18):3279-88.

Alvers A, Fishwick L, Wood M, Hu D, Chung H, Dunn WJ, et al. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2009 Aug;8(4):353-69.

Ausubel FM. *Current protocols in molecular biology*. New York: Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley; 1989.

Bakker B, Overkamp K, van Maris AJ, Kötter P, Luttik M, van Dijken JP, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2001 Jan;25(1):15-37.

Balaban R. The mitochondrial proteome: a dynamic functional program in tissues and disease states. *Environ Mol Mutagen*. 2010 Jun;51(5):352-9.

Barros M, Bandy B, Tahara E, Kowaltowski A. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004 Nov;279(48):49883-8.

Barros M, da Cunha F, Oliveira G, Tahara E, Kowaltowski A. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mech Ageing Dev*. 2010 2010 Jul-Aug;131(7-8):494-502.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) – Grupo de Vancouver.

Barton A. Some aspects of cell division in *saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1950 Jan;4(1):84-6.

Bevilacqua L, Ramsey J, Hagopian K, Weindruch R, Harper M. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 May;286(5):E852-61.

Banerjee S, Banerjee P, Zirkin B, Brown T. Regional expression of transforming growth factor- α in rat ventral prostate during postnatal development, after androgen ablation, and after androgen replacement. *Endocrinology*. 1998 Jun;139(6):3005-13.

Bevilacqua L, Ramsey J, Hagopian K, Weindruch R, Harper M. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Sep;289(3):E429-38.

Birnboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979 Nov;7(6):1513-23.

Blackstock W, Weir M. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999 Mar;17(3):121-7.

Blasco M. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):611-22.

Bonawitz N, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, Shadel G. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab*. 2007 Apr;5(4):265-77.

Caldeira da Silva C, Cerqueira F, Barbosa L, Medeiros M, Kowaltowski A. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*. 2008 Aug;7(4):552-60.

Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, et al. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology*. 2008 Jun;9(3):183-96.

Caro P, Gómez J, Sánchez I, López-Torres M, Barja G. [Effect of restricting amino acids except methionine on mitochondrial oxidative stress]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2009 2009 Jul-Aug;44(4):194-9.

Carrì M, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, et al. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*. 1997 Sep;414(2):365-8.

Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de León A, et al. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci*. 2008 Apr;28(16):4115-22.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):527-605.

Charni S, de Bettignies G, Rathore M, Aguiló J, van den Elsen P, Haouzi D, et al. Oxidative Phosphorylation Induces De Novo Expression of the MHC Class I in Tumor Cells through the ERK5 Pathway. *J Immunol*. 2010 Aug.

Clark LJ, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*. 1962 Oct;102:29-45.

Crabtree H. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J*. 1929;23(3):536-45.

Cuervo A, Bergamini E, Brunk U, Dröge W, French M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*. 2005 Oct-Dec;1(3):131-40.

Dal Canto M, Gurney M. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1997 Jun;93(6):537-50.

Daum G, Böhni P, Schatz G. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 1982 Nov;257(21):13028-33.

De Deken R. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol*. 1966 Aug;44(2):149-56.

Defossez P, Prusty R, Kaerberlein M, Lin S, Ferrigno P, Silver P, et al. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell*. 1999 Apr;3(4):447-55.

DeLuna A, Avendano A, Riego L, Gonzalez A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem*. 2001 Nov;276(47):43775-83.

Deng H, Hentati A, Tainer J, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 1993 Aug;261(5124):1047-51.

DeRisi J, Iyer V, Brown P. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 1997 Oct;278(5338):680-6.

Dickinson J, Dawes I. The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1992 Oct;138(10):2029-33.

Dickinson J, Roy D, Dawes I. A mutation affecting lipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1986 Jul;204(1):103-7.

Doherty, D. L. -Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol*. 1970; 17:850–856.

Douette P, Gerkens P, Navet R, Leprince P, De Pauw E, Sluse F. Uncoupling protein 1 affects the yeast mitoproteome and oxygen free radical production. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan;40(2):303-15.

Douette P, Sluse F. Mitochondrial uncoupling proteins: new insights from functional and proteomic studies. *Free Radic Biol Med*. 2006 Apr;40(7):1097-107.

D'Souza G, Wagle M, Saxena V, Shah A. Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug.

Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci*. 2010 Aug;87(7-8):197-214.

Fabrizio P, Longo V. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2003 Apr;2(2):73-81.

Fang J, Beattie D. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med*. 2003 Feb;34(4):478-88.

Faye G, Kujawa C, Fukuhara H. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. IV. In vivo transcription products of mitochondrial DNA and localization of 23 S ribosomal RNA in petite mutants of *saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*. 1974 Sep;88(1):185-203.

Ferranti R, da Silva M, Kowaltowski A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett.* 2003 Feb;536(1-3):51-5.

Fiechter A, Fuhrmann G, Käppeli O. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol.* 1981;22:123-83.

Frey T, Mannella C. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jul;25(7):319-24.

Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap A, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci.* 1998 Jul;18(14):5151-9.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.

Gancedo J. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun;62(2):334-61.

Goffeau A, Barrell B, Bussey H, Davis R, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 genes. *Science.* 1996 Oct;274(5287):546, 63-7.

Goldberg A, Bourque S, Kyryakov P, Gregg C, Boukh-Viner T, Beach A, et al. Effect of calorie restriction on the metabolic history of chronologically aging yeast. *Exp Gerontol.* 2009 Sep;44(9):555-71.

Görg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis.* 1995 Jul;16(7):1079-86.

Green D, Reed J. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998 Aug;281(5381):1309-12.

Greiner E, Guppy M, Brand K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. J Biol Chem. 1994 Dec;269(50):31484-90.

Griffin T, Gygi S, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, et al. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Proteomics. 2002 Apr;1(4):323-33.

Griffiths E, Halestrap A. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. Biochem J. 1995 Apr;307 (Pt 1):93-8.

Gurney M. Correction. Science. 1995 Jul;269(5221):149.

Gurney M. Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol. 1997 May;244 Suppl 2:S15-20.

Gurney M, Pu H, Chiu A, Dal Canto M, Polchow C, Alexander D, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science. 1994 Jun;264(5166):1772-5.

Gygi S, Rochon Y, Fianza B, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):1720-30.

Hagopian K, Ramsey J, Weindruch R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. Exp Gerontol. 2003 Mar;38(3):267-78.

Halestrap A, Kerr P, Javadov S, Woodfield K. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. Biochim Biophys Acta. 1998 Aug;1366(1-2):79-94.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992 Nov;59(5):1609-23.

Hansen R, Pearson S, Brosnan J, Meaden P, Jamieson D. Proteomic analysis of a distilling strain of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial grain fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Aug;72(1):116-25.

Hara M, Cascio M, Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta.* 2006 May;1762(5):502-9.

Harbison C, Gordon D, Lee T, Rinaldi N, Macisaac K, Danford T, et al. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature.* 2004 Sep;431(7004):99-104.

Heitman J, Movva N, Hall M. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991 Aug;253(5022):905-9.

Henderson K, Gottschling D. A mother's sacrifice: what is she keeping for herself? *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Dec;20(6):723-8.

Hill RL, Bradshaw RA. Fumarase. *Methods in Enzymol.* 1969. 13: 91-99

Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol.* 1999 Aug;12(1):35-73.

Hung G, Brown C, Wolfe A, Liu J, Chiang H. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J Biol Chem.* 2004 Nov;279(47):49138-50.

Jazwinski S. New clues to old yeast. *Mech Ageing Dev.* 2001 Jul;122(9):865-82.
Jewett M, Hofmann G, Nielsen J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2006 Apr;17(2):191-7.

Jiang J, Jaruga E, Repnevskaya M, Jazwinski S. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2135-7.

Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999 Oct;13(19):2570-80.

Kaeberlein M, Powers Rr, Steffen K, Westman E, Hu D, Dang N, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science.* 2005 Nov;310(5751):1193-6.

Karlsson J, Fong K, Hansson M, Elmér E, Csiszar K, Keep M. Life span extension and reduced neuronal death after weekly intraventricular cyclosporin injections in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosurg.* 2004 Jul;101(1):128-37.

Kennedy B, Austriaco NJ, Guarente L. Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 2):1985-93.

Kennedy B, Austriaco NJ, Zhang J, Guarente L. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell.* 1995 Feb;80(3):485-96.

Kirkinezos I, Bacman S, Hernandez D, Oca-Cossio J, Arias L, Perez-Pinzon M, et al. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci.* 2005 Jan;25(1):164-72.

Knowles M, Cervino S, Skynner H, Hunt S, de Felipe C, Salim K, et al. Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics.* 2003 Jul;3(7):1162-71.

Kosterlitz H. The fermentation of galactose and galactose-1-phosphate. *Biochem J.* 1943 Sep;37(3):322-6.

Kowaltowski A. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Feb;33(2):241-50.

Kowaltowski A, Cosso R, Campos C, Fiskum G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem.* 2002 Nov;277(45):42802-7.

Kowaltowski A, de Souza-Pinto N, Castilho R, Vercesi A. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug;47(4):333-43.

Kowaltowski A, Turin J, Indig G, Vercesi A. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. *J Bioenerg Biomembr.* 1999 Dec;31(6):581-90.

Kretschmar M, Nichterlein T, Nebe C, Hof H, Burger K. Fungicidal effect of thyrothricin on *Candida albicans*. *Mycoses.* 1996 1996 Jan-Feb;39(1-2):45-50.

Lashkari D, DeRisi J, McCusker J, Namath A, Gentile C, Hwang S, et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov;94(24):13057-62.

Laun P, Bruschi C, Dickinson J, Rinnerthaler M, Heeren G, Schwimbersky R, et al. Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7514-26.

Lee T, Rinaldi N, Robert F, Odom D, Bar-Joseph Z, Gerber G, et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2002 Oct;298(5594):799-804.

Leloir L. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochem.* 1951 Sep;33(2):186-90.

Lemasters J, Qian T, Elmore S, Trost L, Nishimura Y, Herman B, et al. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors*. 1998;8(3-4):283-5.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan;132(1):27-42.

Lin S, Defossez P, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000 Sep;289(5487):2126-8.

Lin S, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev*. 2004 Jan;18(1):12-6.

Lin S, Kaeberlein M, Andalis A, Sturtz L, Defossez P, Culotta V, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 2002 Jul;418(6895):344-8.

Liu J, Lillo C, Jonsson P, Vande Velde C, Ward C, Miller T, et al. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*. 2004 Jul;43(1):5-17.

Longo V, Gralla E, Valentine J. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem*. 1996 May;271(21):12275-80.

López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2002 May;32(9):882-9.

Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Lum J, Bauer D, Kong M, Harris M, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005 Jan;120(2):237-48.

Mager W, Winderickx J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 May;26(5):265-73.

Massey V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem*. 1994 Sep;269(36):22459-62.

Mathy G, Navet R, Gerken P, Leprince P, De Pauw E, Sluse-Goffart C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* mitoproteome plasticity in response to recombinant alternative ubiquinol oxidase. *J Proteome Res*. 2006 Feb;5(2):339-48.

Mathy G, Navet R, Gerken P, Leprince P, De Pauw E, Sluse-Goffart C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* mitoproteome plasticity in response to recombinant alternative ubiquinol oxidase. *J Proteome Res*. 2006 Feb;5(2):339-48.

Matsumoto A, Comatas K, Liu L, Stamler J. Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science*. 2003 Aug;301(5633):657-61.

Matsuo M. Oxygen dependency of life-span in the nematode. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. 1993 Aug;105(4):653-8.

Medvedev Z. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990 Aug;65(3):375-98.

Meijer M, Boonstra J, Verkleij A, Verrips C. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J Biol Chem*. 1998 Sep;273(37):24102-7.

Meisinger C, Sommer T, Pfanner N. Purification of *Saccharomcyes cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem*. 2000 Dec;287(2):339-42.

Merry B. Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:180-98.

Millard P, Roth B, Thi H, Yue S, Haugland R. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jul;63(7):2897-905.

Morris J, Tissenbaum H, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1996 Aug;382(6591):536-9.

Mortimer R, Johnston J. Life span of individual yeast cells. *Nature.* 1959 Jun;183(4677):1751-2.

Müller I, Zimmermann M, Becker D, Flömer M. Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev.* 1980 Jan;12(1):47-52.

Mustea I, Muresian T. Crabtree effect in some bacterial cultures. *Cancer.* 1967 Sep;20(9):1499-501.

Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry.* 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2005.

Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3.* Amsterdam ; Boston: Academic Press; 2002.

Nicholls D, Locke R. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 1984 Jan;64(1):1-64.

Ohlmeier S, Kastaniotis A, Hiltunen J, Bergmann U. The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem.* 2004 Feb;279(6):3956-79.

Ohnishi T, Sottocasa G, Ernster L. Current approaches to the mechanism of energy-coupling in the respiratory chain. Studies with yeast mitochondria. Bull Soc Chim Biol (Paris). 1966;48(11):1189-203.

Oliveira G, Tahara E, Gombert A, Barros M, Kowaltowski A. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. J Bioenerg Biomembr. 2008 Aug;40(4):381-8.

Onishi T. Mechanism of electron transport and energy conservation in the site I region of the respiratory chain. Biochim Biophys Acta. 1973 Dec;301(2):105-28.

Panozzo C, Nawara M, Suski C, Kucharczyka R, Skoneczny M, Bécam A, et al. Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 2002 Apr;517(1-3):97-102.

Parrella E, Longo V. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. Methods. 2008 Dec;46(4):256-62.

Patterson R, van Rossum D, Kaplin A, Barrow R, Snyder S. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca²⁺ release via locally derived NADH. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb;102(5):1357-9.

Patterson S, Aebersold R. Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet. 2003 Mar;33 Suppl:311-23.

Petranovic D, Nielsen J. Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? Trends Biotechnol. 2008 Nov;26(11):584-90.

Pickrell A, Moraes C. What role does mitochondrial stress play in neurodegenerative diseases? Methods Mol Biol. 2010;648:63-78.

Powers Rr, Kaeberlein M, Caldwell S, Kennedy B, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.* 2006 Jan;20(2):174-84.

Rabizadeh S, Gralla E, Borchelt D, Gwinn R, Valentine J, Sisodia S, et al. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar;92(7):3024-8.

Reaume A, Elliott J, Hoffman E, Kowall N, Ferrante R, Siwek D, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):43-7.

Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 Mar;362(6415):59-62.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Santt O, Pfirrmann T, Braun B, Juretschke J, Kimmig P, Scheel H, et al. The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell.* 2008 Aug;19(8):3323-33.

Schiestl R, Gietz R. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* 1989 Dec;16(5-6):339-46.

Schmelzle T, Hall M. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000 Oct;103(2):253-62.

Schriner S, Linford N, Martin G, Treuting P, Ogburn C, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to

mitochondria. *Science*. 2005 Jun;308(5730):1909-11.

Schwikowski B, Uetz P, Fields S. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*. 2000 Dec;18(12):1257-61.

Sentheshanmuganathan S. The purification and properties of the tyrosine-2-oxoglutarate transaminase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 1960 Dec;77:619-25.

SGD project. "Saccharomyces Genome Database" Disponível em : <http://www.yeastgenome.org>.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996 Mar;68(5):850-8.

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer H, et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov;100(23):13207-12.

Sinclair D, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*. 1997 Dec;91(7):1033-42.

Small W, McAlister-Henn L. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1998 Aug;180(16):4051-5.

Sobko A. Systems biology of AGC kinases in fungi. *Sci STKE*. 2006 Sep;2006(352):re9.

Sohal R, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996 Jul;273(5271):59-63.

Starkov A, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo B, Browne S, Patel M, et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2004 Sep;24(36):7779-88.

Susin S, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug;1366(1-2):151-65.

Tahara E, Barros M, Oliveira G, Netto L, Kowaltowski A. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J*. 2007 Jan;21(1):274-83.

Tahara E, Navarete F, Kowaltowski A. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 2009 May;46(9):1283-97.

ter Schure E, Silljé H, Verkleij A, Boonstra J, Verrips C. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1995 Nov;177(22):6672-5.

Teusink B, Diderich J, Westerhoff H, van Dam K, Walsh M. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J Bacteriol*. 1998 Feb;180(3):556-62.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*. 2004 Sep;24(36):7771-8.

Trumbly R. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1992 Jan;6(1):15-21.

Tseng Y, Cypess A, Kahn C. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jun;9(6):465-82.

Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct;552(Pt 2):335-44.

Turrens J, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1980 Nov;191(2):421-7.

Tzagoloff A, Akai A, Needleman R. Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *J Biol Chem*. 1975 Oct;250(20):8228-35.

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield T, Judson R, Knight J, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2000 Feb;403(6770):623-7.

Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, et al. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. 2007 Jun;26(5):663-74.

Usaite R, Wohlschlegel J, Venable J, Park S, Nielsen J, Olsson L, et al. Characterization of global yeast quantitative proteome data generated from the wild-type and glucose repression *saccharomyces cerevisiae* strains: the comparison of two quantitative methods. *J Proteome Res*. 2008 Jan;7(1):266-75.

Villas-Bôas S, Moxley J, Akesson M, Stephanopoulos G, Nielsen J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J*. 2005 Jun;388(Pt 2):669-77.

Walker GM. Yeast physiology and biotechnology. Chichester ; New York: J. Wiley & Sons; 1998, p. 217.

Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, et al. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. PLoS Genet. 2008 Jan;4(1):e13.

Woodward J, Cirillo V. Amino acid transport and metabolism in nitrogen-starved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1977 May;130(2):714-23.

Wullschleger S, Loewith R, Hall M. TOR signaling in growth and metabolism. Cell. 2006 Feb;124(3):471-84.

Yeaman S. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. Biochem J. 1989 Feb;257(3):625-32.

Yu B. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic Biol Med. 1996;21(5):651-68.

Zhang Y, Qi H, Taylor R, Xu W, Liu L, Jin S. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. Autophagy. 2007 Jul-Aug;3(4):337-46.

Zheng X, Schreiber S. Target of rapamycin proteins and their kinase activities are required for meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr;94(7):3070-5.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland R. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem. 1997 Nov;253(2):162-8.

Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*. 2001 Sep;293(5537):2101-5.

7 Material Suplementar

Tabela S1: Mitoproteoma – proteínas identificadas por espectrometria de massas MS/MS e MALDI/TOF.

Tabela S1 - Características das proteínas moduladas na RC - proteínas que possuíam variação com significância estatística foram organizadas de acordo com sua função em database do banco de dados NCBI (www.matrixscience.com). Abreviações: Mw, peso molecular; pI, ponto isoelétrico; AN, nome de acesso de acordo com o MASCOT; t - test, Student's test em cada condição; V, variação, a amplitude da variação em que o valor positivo indica em quantas vezes a proteína esta aumentada (o valor negativo indica sempre um decréscimo segundo a relação 1/ [V]); MS, parâmetro de melhor identificação para determinação por espectroscopia de massa; MS / MS, parâmetro de melhor identificação por MALDI / TOF; N, número da mancha no gel determinado pelo software

Spot	Protein Name	AN	Mw	pI	MS	MS/MS	ANOVA-1	0.5% 64H / 0.5% 16H		2.0% 64H / 2.0% 16H		0.5% 64H / 2.0% 64H		0.5% 16H / 2.0% 16H	
							F	t-test	V	t-test	V	t-test	Ratio	t-test	Ratio
Mitochondrial															
	Amino acid Biosynthesis / Catabolism														
723	Homoisocitrate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.1.41)	LYS12_YEAST	40329.00	9.04	209	45	0,003	0,10	-1,23	0,01	-1,63	0,75	-1,04	0,02	-1,38
157	Homoaconitase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.36) (Homoac)	LYS4_YEAST	75617.00	7.18	68		0,008	0,14	-1,39	0,00	-1,99	0,55	1,14	0,19	-1,26
233	Acetolactate synthase catalytic subunit, mitochondrial precursor	ILVB_YEAST	75061.00	9.18	141	47	0,008	0,07	-1,46	0,02	-1,44	0,15	-1,3	0,07	-1,28
234	Acetolactate synthase catalytic subunit, mitochondrial precursor	ILVB_YEAST	75061.00	9.18	88	65	0,007	0,04	-1,44	0,02	-1,65	0,92	1,02	0,29	-1,12
243	Acetolactate synthase catalytic subunit, mitochondrial precursor	ILVB_YEAST	75061.00	9.18	184	61	0,000	0,00	-1,76	0,00	-1,74	0,33	-1,12	0,16	-1,11
286	2-isopropylmalate synthase (EC 2.3.3.13) (Alpha-isopropylmal)	LEU1_YEAST	68880.00	5.63	153		0,039	0,07	-1,74	0,13	-1,19	0,15	-1,39	0,86	1,04
288	2-isopropylmalate synthase (EC 2.3.3.13) (Alpha-isopropylmal)	LEU1_YEAST	68880.00	5.63	145		0,034	0,20	-1,38	0,01	-1,87	0,57	1,2	0,32	-1,14
470	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.3.1.3)	GLYM_YEAST	53881.00	9.37	103	61	0,014	0,43	-1,15	0,01	-1,37	0,19	-1,24	0,02	-1,47
471	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.3.1.3)	GLYM_YEAST	53881.00	9.37	91		0,003	0,31	-1,11	0,01	-1,25	0,09	-1,22	0,00	-1,37
488	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (EC 2.1.2.1) (Ser)	GLYC_YEAST	52471.00	7.18	112	37	0,002	0,00	2,61	0,04	3,74	0,10	-2,69	0,01	-1,87
492	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (EC 2.1.2.1) (Ser)	GLYC_YEAST	52471.00	7.18	81		0,009	0,25	-1,13	0,84	1,07	0,04	-1,85	0,00	-1,52
1254	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic (EC 2.1.2.1) (Ser)	GLYC_YEAST	52471.00	7.18	94	37	0,007	0,01	3,03	0,03	3,59	0,53	-1,43	0,08	-1,21

	cytosolic (EC 2.1.2.1) (Ser														
584	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.1.2.10	GCST_YEAS T	44612.00	9.44	104	44	0,0015	1	1	0,0069	-2,38	0,66	1,08	0,0018	-2,21
585	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.1.2.10	GCST_YEAS T	44612.00	9.44	102	66	0,003	0,38	1,11	0,01	-1,69	0,62	1,07	0,00	-1,74
587	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (EC 2.1.2.10	GCST_YEAS T	44612.00	9.44	78		0,014	0,13	-1,39	0,02	-1,8	0,63	-1,13	0,02	-1,46
376	Threonine dehydratase, mitochondrial precursor (EC 4.3.1.19)	THDH_YEAS T	64076.00	9.27	279	41	0,027	0,84	-1,02	0,01	-1,68	0,61	1,13	0,00	-1,47
	branched-chain amino acids														
740	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial pr	BCA1_YEAS T	43797.00	9.57	60		0,000	0,00	-3,2	0,00	-2,12	0,00	-1,91	0,04	-1,27
321	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.	ILV3_YEAST	63391.00	8.80	84	42	0,001	0,02	-2,18	0,04	-1,52	0,02	-2,15	0,06	-1,5
326	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.	ILV3_YEAST	63391.00	8.80	204	53	0,000	0,01	-2,58	0,00	-2,02	0,02	-1,85	0,02	-1,45
331	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.	ILV3_YEAST	63391.00	8.80	96	43	0,000	0,02	-1,92	0,00	-2	0,09	-1,26	0,13	-1,31
334	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.	ILV3_YEAST	63391.00	8.80	186		0,000	0,00	-2,67	0,00	-2,55	0,02	-1,61	0,04	-1,54
730	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor (EC 1.1	ILV5_YEAST	44512.00	9.57	163	63			0		0				
1222	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor (EC 1.1	ILV5_YEAST	44512.00	9.57	216	200	0,001	0,01	-1,6	0,00	-1,88	0,29	1,12	0,70	-1,04
1249	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor (EC 1.1	ILV5_YEAST	44512.00	9.57	221	87	0,000	0,00	-1,67	0,00	-1,52	0,25	-1,1	0,90	-1,01
	Protein Metabolism/synthesis														
806	37S ribosomal protein MRP1, mitochondrial precursor - Saccha	RT01_YEAS T	36877.00	9.66	67		0,013	0,03	5,5	0,03	4,53	0,70	-1,15	0,48	-1,39
1183	rRNA-processing protein UTP23 (U3-associated protein 23) - S	UTP23_YEAS T	29068.00	10.70	49		0,003	0,01	-1,42	0,21	-1,25	0,10	1,42	0,00	1,61
140	Elongation factor G 1, mitochondrial precursor (mEF-	EFG1_YEAS T	85090.00	6.44	149		0,007	0,08	-1,76	0,00	-1,34	0,06	-1,8	0,03	-1,37

	G-1) (EF														
145	Elongation factor G 1, mitochondrial precursor (mEF-G-1) (EF	EFG1_YEAS T	85090.00	6.44	173	25	0,027	0,13	-1,76	0,01	-1,74	0,28	-1,43	0,04	-1,41
614	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor (tufM) - Sacch	EFTU_YEAS T	48113.00	6.19	108		0,022	0,37	-1,17	0,00	-1,67	0,23	1,28	0,30	-1,11
615	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor (tufM) - Sacch	EFTU_YEAS T	48113.00	6.19	101		0,005	0,02	1,29	0,07	-1,44	0,00	1,8	0,89	-1,03
619	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor (tufM) - Sacch	EFTU_YEAS T	48113.00	6.19	120		0,001	0,03	-1,6	0,00	-2,11	0,56	1,11	0,12	-1,19
517	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) (Translation elongati	EF1A_YEAS T	50400.00	9.82	74		0,001	0,00	8,44	0,05	5,36	0,50	-1,84	0,00	-2,89
	Protein folding and translocation														
215	Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor (mtHSP70) (	HSP77_YEA ST	70585.00	5.35	132	82	0,024	0,29	1,22	0,01	1,44	0,11	-1,3	0,37	-1,1
216	Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor (mtHSP70) (	HSP77_YEA ST	70585.00	5.35	207	90	0,000	0,01	-2,12	0,00	-1,95	0,06	-1,51	0,03	-1,39
227	Heat shock protein SSA1 (Heat shock protein YG100) - Sacchar	HSP71_YEA ST	69786.00	4.84	83		0,007	0,00	1,74	0,45	-1,24	0,39	-1,36	0,00	-2,94
205	Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor (mtHSP70) (	HSP77_YEA ST	70585.00	5.35	128		0,000	0,02	-2	0,01	-1,93	0,02	-2,24	0,00	-2,16
205	Heat shock protein SSC3, mitochondrial precursor (Extracellu	HSP7E_YEA ST	70042.00	5.87		69			0		0				
207	Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor (mtHSP70) (	HSP77_YEA ST	70585.00	5.35	208	122	0,000	0,01	-2,43	0,00	-2,1	0,01	-1,99	0,00	-1,72
218	Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor (mtHSP70) (	HSP77_YEA ST	70585.00	5.35	115		0,000	0,01	1,92	0,01	1,64	0,29	-1,16	0,04	-1,36
218	Heat shock protein SSC3, mitochondrial precursor (Extracellu	HSP7E_YEA ST	70042.00	5.87		67			0		0				
226	Heat shock protein SSA2 - Saccharomyces cerevisiae (Baker's	HSP72_YEA ST	69599.00	4.79	71		0,002	0,07	1,4	0,20	-1,44	0,17	-1,72	0,00	-3,46

314	Heat shock protein 60, mitochondrial precursor (Stimulator f	HSP60_YEAST	60999.00	5.08	362	61	0,009	0,20	-1,27	0,00	-1,66	0,86	1,05	0,06	-1,25
295	Mitochondrial clpX-like chaperone MCX1 - Saccharomyces cerev	MCX1_YEAST	58195.00	8.54	63		0,002	0,03	-2,06	0,00	-1,71	0,13	-1,54	0,00	-1,27
256	Protein disulfide-isomerase precursor (EC 5.3.4.1) (PDI) (Th	PDI_YEAST	58533.00	4.23	58	75	0,0017	0,01	3,61	0,048	5,66	0,069	-5,11	0,00015	-3,26
1261	Mitochondrial phosphate carrier protein (Phosphate transport	MPCP_YEAST	32962.00	0.00	77		0,031	0,14	1,38	0,04	1,33	0,23	1,28	0,11	1,24
970	Outer mitochondrial membrane protein porin 1 (Voltage-depend	VDAC1_YEAST	30524.00	8.80	49	69	0,000	0,00	-2,06	0,80	1,01	0,00	-1,73	0,02	1,2
975	Outer mitochondrial membrane protein porin 1 (Voltage-depend	VDAC1_YEAST	30524.00	8.80		57	0,035	0,03	-1,47	0,91	-1,01	0,63	-1,07	0,02	1,36
977	Outer mitochondrial membrane protein porin 1 (Voltage-depend	VDAC1_YEAST	30524.00	8.80	74	71	0,001	0,01	-2,04	0,10	-1,2	0,10	-1,34	0,02	1,27
984	Outer mitochondrial membrane protein porin 1 (Voltage-depend	VDAC1_YEAST	30524.00	8.80	110	83	0,000	0,00	-2,34	0,08	-1,27	0,03	-1,61	0,21	1,15
621	Mitochondrial outer membrane 45 kDa protein - Saccharomyces	OM45_YEAST	44553.00	9.07	132		0,025	0,09	-1,5	0,02	1,45	0,24	-1,25	0,01	1,74
1265	Mitochondrial outer membrane 45 kDa protein - Saccharomyces	OM45_YEAST	44553.00	9.07	179		0,000	0,00	-2,2	0,04	1,27	0,01	-1,77	0,01	1,58
220	Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (70 kDa mitochon	TOM70_YEAST	70251.00	5.10	73		0,001	0,01	-2,28	0,06	-1,99	0,04	-2,68	0,01	-2,34
	Protein Import														
539	Mitochondrial-processing peptidase alpha subunit, mitochondr	MPPA_YEAST	53646.00	5.92	73		0,010	0,09	-1,6	0,00	-1,91	0,80	-1,03	0,06	-1,23
559	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondri	MPPB_YEAST	51109.00	6.60	138		0,010	0,56	-1,1	0,00	-1,8	0,64	1,12	0,01	-1,46
	oxydation of fatty acids									0,00					
339	Mitochondrial 2-methylisocitrate lyase (EC 4.1.3.30) (Methyl	ACEB_YEAST	65277.00	7.82	65		0,000	0,01	1,94	0,02	3,93	0,03	2,28	0,01	4,6
	Alcohol metabolism														
443	Potassium-activated aldehyde dehydrogenase, mitochondrial pr	ALDH4_YEAST	56973.00	6.32	84		0,000	0,00	2,35	0,00	2,47	0,03	1,38	0,01	1,45
373	Potassium-activated aldehyde dehydrogenase, mitochondrial pr	ALDH4_YEAST	56973.00	6.32	83		0,002	0,06	2,04	0,01	5	0,64	-1,14	0,11	2,15

297	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	212	51	0,000	0,00	3,94	0,00	3,17	0,00	3,65	0,00	2,94
298	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	309		1,60E-05	0,0042	1,29	0,0044	2,76	0,035	1,52	0,00044	3,26
301	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	165	38	0,003	0,00	1,93	0,31	1,5	0,03	2,25	0,01	1,75
304	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	252	56	0,000	0,00	1,78	0,00	2,63	0,00	2,34	0,00	3,45
305	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	106		0,015	0,03	1,73	0,24	1,89	0,03	2,27	0,13	2,48
306	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	267	88	0,000	0,01	1,43	0,01	2,25	0,01	2	0,00	3,13
1239	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	198	65	0,004	0,96	1,02	0,03	1,53	0,34	1,17	0,00	1,76
1240	Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) (Acetyl-CoA deacylase) (Ac)	ACH1_YEAS T	58903.00	6.31	117	36	0,002	0,14	1,39	0,02	1,66	0,09	1,53	0,00	1,83
Dihydrolipoyl dehydrogenase Complex															
42	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial pre	ODO1_YEAS ST	114744.00	6.79	121		0,002	0,01	2,87	0,15	1,4	0,02	2,31	0,51	1,13
45	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial pre	ODO1_YEAS ST	114744.00	6.79	114	29	0,022	0,03	1,69	0,52	1,18	0,06	1,74	0,25	1,22
1221	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of piruvato dehydrogenase complex	ODP2_YEAS T	51957.00	8.64	76	68	0,002	0,83	1,02	0,00	-1,88	0,05	1,34	0,02	-1,44
	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8	DLDH_YEAS T	54261.00	8.90	140	74	0,026	0,22	1,13	0,42	-1,1	0,06	1,46	0,01	1,18
406	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8	DLDH_YEAS T	54261.00	8.90	156	90	0,006	0,06	1,43	0,26	-1,17	0,02	1,92	0,07	1,14
409	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8	DLDH_YEAS T	54261.00	8.90	100		0,003	0,01	1,96	0,39	1,13	0,04	1,76	0,81	1,02
422	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8	DLDH_YEAS T	54261.00	8.90	76		0,0003	0,0058	3,25	0,012	1,74	0,026	2,24	0,16	1,2

1241	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8	DLDH_YEAS T	54261.00	8.90	150	76	0,003	0,03	1,55	0,42	-1,09	0,02	1,88	0,11	1,11
1251	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondr	ODPA_YEAS ST	46712.00	9.04	99	19	0,009	0,52	-1,09	0,00	-1,68	0,12	1,34	0,09	-1,15
836	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondr	ODPB_YEAS ST	40086.00	5.07	51	46	0,006	0,48	-1,13	0,01	-1,64	0,34	-1,16	0,01	-1,69
1257	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	ODO2_YEAS ST	50456.00	9.39	53	75	0,000	0,03	1,16	0,27	-1,2	0,01	2,17	0,00	1,57
Krebs Cicle / Acid citric cicle															
841	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.1.37)	MDHM_YEAS ST	35685.00	9.18	115		0,006	0,26	-1,11	0,15	-1,27	0,05	1,56	0,00	1,36
863	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.1.37)	MDHM_YEAS ST	35685.00	9.18	81	59	0,012	0,04	-1,18	0,04	-1,51	0,23	1,31	0,52	1,03
1220	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.1.37)	MDHM_YEAS ST	35685.00	9.18	115		0,034	0,80	-1,02	0,47	-1,12	0,09	1,48	0,00	1,35
542	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.2) (Fu	FUMH_YEAS ST	53574.00	9.36	50	134	0,027	0,68	-1,05	0,37	1,2	0,22	1,43	0,00	1,8
605	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor (EC	IDHP_YEAS T	48331.00	9.37	114		0,018	0,62	-1,08	0,02	-2,03	0,96	-1	0,01	-1,88
609	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor (EC	IDHP_YEAS T	48331.00	9.37	196		0,026	0,27	-1,23	0,03	-1,25	0,13	-1,32	0,05	-1,34
611	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor (EC	IDHP_YEAS T	48331.00	9.37	167	87	0,004	0,07	-1,6	0,02	-1,74	0,20	-1,4	0,01	-1,52
1224	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor (EC	IDHP_YEAS T	48331.00	9.37		134	0,001	0,00	-2,65	0,28	-1,15	0,03	-1,78	0,08	1,3
734	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial prec	IDH1_YEAS T	39300.00	9.43	90	59	0,000	0,12	1,21	0,19	-1,13	0,01	1,87	0,00	1,36
1230	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial prec	IDH1_YEAS T	39300.00	9.43		68	0,001	0,02	-1,47	0,00	-1,5	0,76	-1,03	0,51	-1,04
738	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial prec	IDH1_YEAS T	39300.00	9.43	173	70	0,014	0,40	-1,09	0,18	1,18	0,07	1,51	0,00	1,29

751	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.3) (C	IDH2_YEAST	39886.00	9.47	78	51	0,000	0,30	1,05	0,35	-1,05	0,01	1,34	0,00	1,22
110	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.3) (C	ACON_YEAST	85714.00	8.87	207	130	0,050	0,07	-2,36	0,07	-1,49	0,39	-1,25	0,30	1,27
117	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.3) (C	ACON_YEAST	85714.00	8.87	168	74	0,015	0,04	-2,57	0,02	-1,81	0,55	-1,13	0,16	1,26
122	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.3) (C	ACON_YEAST	85714.00	8.87	225	80	0,045	0,11	-1,76	0,02	-1,67	0,73	1,21	0,13	1,28
123	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.3) (C	ACON_YEAST	85714.00	8.87	223	75	0,013	0,04	-2,29	0,02	-1,96	0,94	1,04	0,17	1,22
131	Probable aconitate hydratase 2 (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-l	ACON2_YEAST	87042.00	6.53	60		0,000	0,01	-3,35	0,00	-3,76	0,12	-1,44	0,04	-1,62
571	Citrate synthase, mitochondrial precursor (EC 2.3.3.1) - Sac	CISY1_YEAST	53384.00	8.81	156		0,002	0,28	1,13	0,06	1,52	0,10	1,35	0,00	1,83
576	Citrate synthase, mitochondrial precursor (EC 2.3.3.1) - Sac	CISY1_YEAST	53384.00	8.81		64	0,005	0,03	1,42	0,46	1,13	0,03	1,63	0,02	1,29
579	Citrate synthase, mitochondrial precursor (EC 2.3.3.1) - Sac	CISY1_YEAST	53384.00	8.81	114	83	0,001	0,03	1,47	0,21	1,25	0,02	1,95	0,00	1,65
580	Citrate synthase, mitochondrial precursor (EC 2.3.3.1) - Sac	CISY1_YEAST	53384.00	8.81	136	78	0,002	0,04	1,28	0,37	1,24	0,04	1,75	0,00	1,69
Electron Transport Chain															
254	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, m	DHSA_YEAST	70812.00	7.38	116	76	0,041	0,12	1,56	0,04	2,16	0,69	-1,13	0,51	1,22
987	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mi	DHSB_YEAST	31066.00	10.14	74	41	0,000	0,69	1,01	0,49	1,09	0,01	1,51	0,00	1,64
271	Probable electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoredu	ETFD_YEAST	70103.00	8.67	118	34	0,001	0,11	-1,32	0,00	-3,28	0,05	1,7	0,06	-1,46
356	Cytochrome b2, mitochondrial precursor (EC 1.1.2.3) (L-lacta	CYB2_YEAST	65954.00	9.27	116		0,031	0,02	-2,4	0,84	-1,01	0,23	-1,56	0,03	1,53
1187	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein (Com	UCR7_YEAST	14613.00	5.55	79	67	0,007	0,06	1,29	0,67	1,09	0,04	1,61	0,00	1,36
1192	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein (Com	UCR7_YEAST	14613.00	5.55	61		0,008	0,12	1,25	0,01	1,51	0,60	1,05	0,04	1,28

1184	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein (Com	UCR7_YEAS T	14613.00	5.55	71		0,006	0,08	1,25	0,04	1,35	0,07	1,23	0,06	1,32
607	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1, mit	UQCR1_YEAS T	50254.00	6.93		77			0		0				
728	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mit	UQCR2_YEAS T	40510.00	8.60	142	60	0,000	0,01	1,92	0,53	1,08	0,01	2,19	0,02	1,23
1231	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mit	UQCR2_YEAS T	40510.00	8.60	121	64	0,000	0,00	2,13	0,01	2,21	0,39	1,19	0,02	1,24
736	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mit	UQCR2_YEAS T	40510.00	8.60	156	71	0,009	0,68	1,03	0,72	1,02	0,02	1,25	0,04	1,24
742	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mit	UQCR2_YEAS T	40510.00	8.60	201	63	0,023	0,92	1,01	0,26	-1,18	0,06	1,49	0,02	1,25
1204	Cytochrome c oxidase polypeptide VI, mitochondrial precursor	COX6_YEAS T	17388.00	5.73	71		0,000	0,01	-1,33	0,56	1,06	0,04	1,27	0,00	1,78
755	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mit	UQCR2_YEAS T	40510.00	8.60	135	77	0,021	0,45	1,08	0,39	1,09	0,07	1,29	0,03	1,29
	ATP synthase														
403	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.	ATPA_YEAS T	58629.00	9.49	134		0,001	0,01	1,8	0,02	1,39	0,11	1,35	0,56	1,04
427	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.	ATPA_YEAS T	58629.00	9.49	79		0,001	0,01	4,66	0,03	1,82	0,04	2,68	0,68	1,05
432	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.	ATPA_YEAS T	58629.00	9.49	152		0,008	0,05	1,93	0,05	1,37	0,09	1,72	0,11	1,22
434	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.	ATPA_YEAS T	58629.00	9.49	216		0,028	0,08	1,44	0,78	1,04	0,06	1,6	0,19	1,16
489	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor (EC 3.6.	ATPA_YEAS T	58629.00	9.49	138		0,031	0,14	2,84	0,02	3,38	0,73	1,39	0,08	1,64
493	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC 3.6.3	ATPB_YEAS T	54817.00	5.42	132		0,003	0,04	1,39	0,05	1,36	0,02	1,42	0,06	1,39
502	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC 3.6.3	ATPB_YEAS T	54817.00	5.42	103		0,001	0,01	6,23	0,02	2,57	0,11	2,47	0,91	1,02
508	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC	ATPB_YEAS T	54817.00	5.42	119		0,006	0,02	1,18	0,21	1,2	0,07	1,31	0,01	1,33

	3.6.3														
519	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC 3.6.3)	ATPB_YEAST	54817.00	5.42	136	92	0,000	0,01	1,92	0,19	1,16	0,01	1,99	0,04	1,2
522	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (EC 3.6.3)	ATPB_YEAST	54817.00	5.42	214	36	0,032	0,15	1,19	0,83	-1,01	0,07	1,57	0,02	1,3
1074	ATP synthase subunit 4, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	ATPF_YEAST	27050.00	9.77	60		0,005	0,11	1,35	0,01	1,78	0,25	1,17	0,07	1,54
1078	ATP synthase subunit 4, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	ATPF_YEAST	27050.00	9.77	69		0,002	0,04	1,59	0,06	1,25	0,03	1,66	0,01	1,31
1080	ATP synthase subunit 4, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	ATPF_YEAST	27050.00	9.77	100	59	0,001	0,01	1,43	0,18	1,27	0,02	1,72	0,00	1,52
1085	ATP synthase subunit 4, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	ATPF_YEAST	27050.00	9.77	59		0,000	0,01	1,46	0,00	1,39	0,00	1,75	0,00	1,66
1127	ATP synthase D chain, mitochondrial (EC 3.6.3.14) - Saccharo	ATP7_YEAST	19797.00	9.43	154		0,000	0,01	1,48	0,29	1,24	0,01	2,09	0,00	1,74
	HEME biosynthesis														
731	Ferrochelatase, mitochondrial precursor (EC 4.99.1.1) (Proto	HEMH_YEAST	44739.00	9.59	138	37	0,000	0,06	-1,22	0,00	-1,47	0,91	-1	0,03	-1,21
	Ubiquinone biosynthesis								0						
897	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondria	COQ5_YEAST	34890.00	6.12	61		0,000	0,00	-2,38	0,00	-2,02	0,01	-1,89	0,00	-1,6
	DNA maintenance and cell death														
1191	Protein MMF1, mitochondrial precursor (Maintenance of mitoch	MMF1_YEAST	15955.00	9.84		52	0,000	0,00	-1,99	0,00	-1,82	0,13	-1,15	0,53	-1,06
976	DNA repair protein RAD59 - Saccharomyces cerevisiae (Baker's	RAD59_YEAST	26785.00	9.34	49		0,045	0,07	-1,48	0,07	-1,19	0,78	-1,03	0,10	1,21
1206	Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial prec	RIM1_YEAST	15377.00	8.96	54		0,001	0,08	1,23	0,05	-1,11	0,00	1,55	0,11	1,13
1207	Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial prec	RIM1_YEAST	15377.00	8.96	79	60	0,010	0,51	1,08	0,03	-1,31	0,02	1,53	0,33	1,08

717	Mitochondrial nuclease (EC 3.1.30.-) - <i>Saccharomyces cerevis</i>	NUC1_YEAS T	37528.00	9.62	63		0,000	0,00	-2,33	0,00	-1,97	0,14	-1,31	0,01	-1,1
59	Mitochondrial presequence protease (EC 3.4.24.-) (Cytosolic)	CYM1_YEAS T	112452.00	5.96	61		0,003	0,03	-1,56	0,15	-1,24	0,02	-1,73	0,05	-1,37
720	Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1 - Sacch	LSP1_YEAS T	38048.00	4.47	71		0,043	0,01	6,52	0,27	3,24	0,75	1,04	0,08	-1,94
920	Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1 - Sacch	LSP1_YEAS T	38048.00	4.47	80		0,014	0,01	-1,47	0,09	1,69	0,03	-2,1	0,05	1,19
Stress response															
1040	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 (EC 1.11.1.15) (Thioredoxin	PRX1_YEAS T	29648.00	9.64		44	0,017	0,59	1,07	0,00	1,56	0,68	-1,04	0,07	1,39
1243	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 (EC 1.11.1.15) (Thioredoxin	PRX1_YEAS T	29648.00	9.64	76	47	0,021	0,08	1,2	0,13	1,45	0,31	1,21	0,00	1,46
Cytosolic															
192	78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor (GRP 78)	GRP78_YEA ST	74479.00	4.64	95		0,002	0,00	4,93	0,09	3,07	0,42	-1,71	0,00	-2,74
1015	Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1) (Phosphoglyceromutase	PMG1_YEA ST	27592.00	9.27	59		0,011	0,10	1,38	0,11	-1,27	0,72	-1,05	0,00	-1,84
1007	Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) (PMM) - <i>Saccharomyces cerevi</i>	PMM_YEAS T	29216.00	5.00	86		0,000	0,00	6,59	0,01	9,63	0,06	-4,19	0,01	-2,87
577	Enolase 2 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase 2) (	ENO2_YEAS T	46942.00	5.61	63		0,001	0,38	-1,19	0,00	-3,35	0,76	1,11	0,00	-2,52
1008	Heat shock protein 26 (26 kDa heat shock protein) - Saccharo	HSP26_YEA ST	23865.00	5.19	89		0,001	0,01	5,41	0,01	17,92	0,10	-4,17	0,40	-1,26
1012	Heat shock protein 26 (26 kDa heat shock protein) - Saccharo	HSP26_YEA ST	23865.00	5.19	103		0,000	0,00	10,77	0,01	14,97	0,10	-3,52	0,03	-2,53
499	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14) (V-A	VATA_YEAS T	119246.00	5.77	78	21	0,002	0,01	6,01	0,02	6,38	0,65	-1,4	0,13	-1,32
521	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14) (V-A	VATA_YEAS T	119246.00	5.77	87	61	0,004	0,01	5,75	0,04	5,57	0,70	-1,39	0,06	-1,43
803	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 (EC 1.2.1.12) (GA	G3P3_YEAS T	35838.00	6.52	100		0,002	0,00	1,73	0,03	-1,89	0,18	1,31	0,00	-2,51

811	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 (EC 1.2.1.12) (GA	G3P3_YEAS T	35838.00	6.52	99		0,004	0,02	1,7	0,12	-1,23	0,02	1,9	0,16	-1,11
1245	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 (EC 1.2.1.12) (GA	G3P3_YEAS T	35838.00	6.52	144		0,003	0,00	1,5	0,13	-1,25	0,01	1,69	0,30	-1,11

8 Anexos

Anexo 1: Manuscrito - Tahara E, Barros M, Oliveira G, Netto L, Kowaltowski A. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. FASEB J. 2007 Jan;21(1):274-83.

Anexo 2: Manuscrito - Oliveira G, Tahara E, Gombert A, Barros M, Kowaltowski A. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. J Bioenerg Biomembr. 2008 Aug;40(4):381-8.

Anexo 3: Manuscrito - Barros M, da Cunha F, Oliveira G, Tahara E, Kowaltowski A. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. Mech Ageing Dev. 2010 Jul-Aug;131(7-8):494-502.

Anexo 4: Súmula Curricular

Anexo 1

Tahara E, Barros M, Oliveira G, Netto L, Kowaltowski A. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. FASEB J. 2007 Jan;21(1):274-83.

Anexo 2

Oliveira G, Tahara E, Gombert A, Barros M, Kowaltowski A. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. *J Bioenerg Biomembr*. 2008 Aug;40(4):381-8.

Anexo 3

Barros M, da Cunha F, Oliveira G, Tahara E, Kowaltowski A. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mech Ageing Dev.* 2010 2010 Jul-Aug;131(7-8):494-502.

Anexo 4 - Súmula Curricular

Nome: Graciele Almeida de Oliveira

Local e data de nascimento: São Paulo, 7 de setembro de 1978

EDUCAÇÃO:

Colégio: E. E. Professor Alberto Conte, São Paulo, SP. 1993-1996.

Superior: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2000-2004.

Graduação em Química (Bacharel)

Pós-graduação: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2005-atual

Doutorado Direto em Bioquímica

Bolsas

Bolsa de Iniciação Científica FAPESP, 2001.

Bolsa de Iniciação Científica CNPq/PIBIC-USP, 2002, 2003 e 2004.

Bolsa de estudos graduação Eduardo Panadés, 2001, 2002, 2003 e 2004.

Bolsa de Doutorado Direto FAPESP (05/50054-3), 2005 a 2010.

Bolsa do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) 2006.

Bolsa para Colaboração Internacional FAPESP de abril a outubro de 2007 para projeto de pesquisa colaborativa em Liège, Bélgica.

Prêmios

Menção Honrosa do 12 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP) - 2004

Premiada pelo trabalho "Phosphate increases Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release". Autores: Oliveira, G.A. and Kowaltowski A.J.

Publicação mais relevante para a publicação do Relatório CAPES de 2007, Coordenação do Programa de Bioquímica – 2008.

Premiada pela Coordenação do Programa de Bioquímica pela publicação “Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging”, publicada em FASEB J. 2007 Jan;21(1):274-83. Autores: Tahara E, Barros M, Oliveira G, Netto L, Kowaltowski A.

Young Scientist Program (YSP) Fellowship 2009

Premiada pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) para participar do pré encontro YSP 2009 e do Congresso internacional 21st IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology em Shanghai, China.

Participação no The Gordon Research Conference 2009

Gordon Research Conference: Molecular & Cellular Bioenergetics na Proctor Academy, Andover, NH, Estados Unidos.

Young Scientist Symposium SBBq 2009

Premiada pela Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular: apresentação oral durante a XXXVIII Anual Meeting of Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

Publicações:

Oliveira G, Kowaltowski A. Phosphate increases mitochondrial reactive oxygen species release. Free Radic Res. 2004 Oct;38(10):1113-8.

Tahara E, Barros M, **Oliveira G**, Netto L, Kowaltowski A. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. FASEB J. 2007 Jan;21(1):274-83.

Oliveira G, Tahara E, Gombert A, Barros M, Kowaltowski A. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. *J Bioenerg Biomembr*. 2008 Aug;40(4):381-8.

Barros M, da Cunha F, **Oliveira G**, Tahara E, Kowaltowski A. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mech Ageing Dev*. 2010 2010 Jul-Aug;131(7-8):494-502.

Participação em Congressos:

2003 - 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP). Regulação da Geração de H₂O₂ em Mitocôndrias Isoladas de Cérebro de Rato.

2004 - Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP. Regulação da Geração de H₂O₂ Mitochondrial por Fosfato Inorgânico.

2004 - XII Congress of Brazilian Society for Cell Biology; IX Ibero-American Congress of Cell Biology (Campinas, SP). Phosphate Increases Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release.

2004 - 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. (São Paulo, SP). Fosfato Aumenta a Geração de Espécies Reativas de Oxigênio Mitochondrial.

2004 - I Encontro Paulista em Ensino de Química (EPPEQ) (Campinas, SP). Divulgação Científica como Ferramenta para a Construção da Visão de Ciência e Cientista entre Estudantes do Ensino Fundamental.

2005 - 57º Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) (Fortaleza, CE). Fosfato Aumenta a Geração de H₂O₂ Mitochondrial.

2006 - XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. (Águas de Lindóia, SP). Respiration, Oxidative Stress and Chronological Life Span in *S. cerevisiae*.

2008 - XXXVII Annual meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). (Águas de Lindóia, SP). The Role of Glucose Repression in Yeast Life Span.

2009 - XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian and Molecular Biology Society. (Águas de Lindóia, SP). The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast.

2009 - SBBq Cone Sul Symposium - XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia, SP). The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast.

2009 - Young Scientist Program - Union of Biochemistry and Molecular Biology. (Xangai, China). The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast.

2009 - 21st IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. (Xangai, China). The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast.

2009 - Gordon Research Conference - Molecular & Cellular Bioenergetics From Crystal Structures To Human Disease (Andover, NH). The Role of Glucose Restriction on Amino Acid Metabolism and Life Span in Yeast.

2010 - XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq (Foz do Iguaçu, PR). Role of glucose signaling and mitochondrial aminoacid metabolism in yeast longevity.

2010 - RU Chemistry hosts U. São Paulo Inst. Química (New Jersey). The role of glucose signaling and mitochondrial aminoacid metabolism in yeast longevity.

Trabalhos publicados em anais de eventos:

2003 – Oliveira GA, Kowaltowski, AJ. Regulação da Geração de H₂O₂ Mitocôndrias Isoladas de Cérebro de Rato. 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP).

2004 - Oliveira GA, Kowaltowski, AJ. Regulação da Geração de H₂O₂ Mitochondrial por Fosfato Inorgânico. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP.

2004 - Oliveira GA, Kowaltowski, AJ. Phosphate Increases Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release XII Congress of Brazilian Society for Cell Biology; IX Ibero-American Congress of Cell Biology (Campinas, SP).

2004 - Oliveira GA, Kowaltowski, AJ. Fosfato Aumenta a Geração de Espécies Reativas de Oxigênio Mitochondrial 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. (São Paulo, SP).

2004 – Oliveira GA. Divulgação Científica como Ferramenta para a Construção da Visão de Ciência e Cientista entre Estudantes do Ensino Fundamental. I Encontro Paulista em Ensino de Química (EPPEQ) (Campinas, SP).

2005 - Oliveira GA, Kowaltowski, AJ. Fosfato Aumenta a Geração de H₂O₂ Mitochondrial. 57º Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) (Fortaleza, CE).

2006 – Oliveira GA, Tahara EB, Kowaltowski, AJ. Respiration, Oxidative Stress and Chronological Life Span in *S. cerevisiae*. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. (Águas de Lindóia, SP).

2006 - Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LS, Kowaltowski AJ Dihydrolipoyl Dehydrogenase as a Novel Mitochondrial Reactive Oxygen

Species Source in *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of Calorie Restriction and NAD⁺ levels. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Águas de Lindóia, SP).

2006 – Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LS, Kowaltowski AJ. Dihidrolipoil Desidrogenase como uma Nova Fonte de Espécies Reativas de Oxigênio em *Saccharomyces cerevisiae* (São Paulo, SP) 14^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo.

2006 - Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LS, Kowaltowski AJ. Life span-enhancing caloric restriction requires dihydrolipoyl dehydrogenase to prevent oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. 13th Biennial Congress of the International Society for Free Radical Research (Davos).

2008 - Oliveira GA, Tahara EB, Barros MH, Gombert AK, Kowaltowski, AJ. The Role of Glucose Repression in Yeast Life Span. XXXVII Annual meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). (Águas de Lindóia, SP).

2009 - Oliveira GA, Tahara EB, Barros MH, Gombert AK, Kowaltowski, AJ. The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast. XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian and Molecular Biology Society. (Águas de Lindóia, SP).

2009 – Oliveira GA, Sluse FE, Kowaltowski AJ. The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast. SBBq Cone Sul Symposium - XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia, SP).

2009 - Oliveira GA, Sluse FE, Kowaltowski AJ. The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast. Young Scientist Program - Union of Biochemistry and Molecular Biology. (Xangai, China).

2009 - Oliveira GA, Sluse FE, Kowaltowski AJ. The Role of Glucose Restriction on Aminoacid Metabolism and Life Span in Yeast. 21st IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. (Xangai, China).

2010 - Oliveira GA, Barros MH, Kowaltowski AJ. Role of glucose signaling and mitochondrial aminoacid metabolism in yeast longevity. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq (Foz do Iguaçu, PR).

2010 - Oliveira GA, Barros MH, Kowaltowski AJ. The role of glucose signaling and mitochondrial aminoacid metabolism in yeast longevity. RU Chemistry hosts U. São Paulo Inst. Química (New Jersey).

Organização de eventos

2009 - I Encontro de Pós - Graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 13 e 14 de Agosto, coordenação docente Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, coordenação discente Graciele A Oliveira.

Informação complementar:

2005 – 2006 – Representante discente no Conselho do Departamento de Bioquímica do IQ-USP.

2005 – 2006 – Representante discente na Congregação do IQ – USP.

2006 – 2008 - Representante discente na Comissão de Pós-Graduação do IQ-USP.

2007 – 2008 – Representante discente na Comissão de Cultura e Extensão Universitária.