VITTORIA DE LIMA CAMANDONA

**Análise do efeito da superexpressão de HSP27 humana na
longevidade de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas
Tecnológicas para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

VITTORIA DE LIMA CAMANDONA

**Análise do efeito da superexpressão de HSP27 humana na
longevidade de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a). José Ribamar dos Santos Ferreira
Júnior

“Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se
disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca
digital de teses e dissertações da USP (BDTD).”

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Camandona, Vittoria de Lima
ANÁLISE DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE HSP27
HUMANA NA LONGEVIDADE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE /
Vittoria de Lima Camandona; orientador José Ribamar
dos Santos Ferreira Júnior. -- São Paulo, 2018.
90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HSP27. 2. Longevidade. 3. Saccharomyces
cerevisiae. 4. Biologia molecular. 5. Gerontologia.
I. Ferreira Júnior, José Ribamar dos Santos,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Vittoria de Lima Camandona

Título da Dissertação: Análise do efeito da superexpressão de HSP27 humana na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador(a): Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a
dia / mês / ano, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Orientador do projeto de Mestrado: “Análise do efeito da superexpressão de HSP27 humana na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*”

Prezado Professor,

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata. Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Prof.^a Dr.^a Fabiana de Sant’Anna Evangelista

Coordenadora do Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação – CEUA

Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Universidade de São Paulo

Dedico a minha tese a todos e todas, sem exceção. Que os frutos desta dissertação sejam utilizados como ferramenta para a geração de novos conhecimentos científicos, com intuito de promover qualidade de vida e uma longevidade digna aos seres vivos de um planeta chamado Terra.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos indivíduos que me concederam a vida: Deus, mamãe e papi. Meu primeiro exemplo de ser feminino no mundo também foi o pioneiro em me despertar interesse pelo estudo. Sempre dedicada a mim e aos seus inúmeros livros de psicologia. E ao meu papi também, exemplo de um processo de envelhecimento bem sucedido, 78 anos, e que ainda cultiva seus livros escolares de matemática e física – devidamente encapados, com muito zelo.

Em relação à família nuclear, não poderia faltar agradecimentos ao meu maninho Rostam, te ver estudando desde pequena sempre foi tão motivador! Meu melhor amigo. E a minha “boadrasta” Maria, exemplo de compaixão imenso! Entender o outro é por vezes impossível. Compreender é opção e respeito é dever. Você faz tudo isso e muito mais por mim e nossa família!

Agradeço as minhas queridas professoras do colégio Carol, Mariângela, Rosângela e Sylmara. São tantos os motivos pelos quais admiro vocês que neste pouco espaço de agradecimento, me resta concluir isso com um muito obrigado de todo o meu coração!

Agradeço também a todos os docentes da faculdade, em especial prof.a Caroline , Beatriz e Silvia – minhas inspirações profissionais e pessoais. E destaque para o prof. Chambergo por compartilhar o uso de equipamentos no laboratório, auxiliando na pesquisa de todos. Obrigada.

Em relação aos docentes da pós, prof. Mário, prof.a Renata e Fernanda Cunha. Se hoje tenho a possibilidade de obter o título de mestre, é porque há 5 anos o prof. Mário em momentos de crise EACHianas cedeu o espaço de seu laboratório para realizar a minha primeira (e única) iniciação científica. E coincidência ou não, o último experimento do mestrado foi concretizado por sua causa também. Já a prof.a Renata, agradeço, entre muitas coisas, a oportunidade de conhecer alguém tão sábia e dedicada, quanto é meiga e delicada como pessoa. Uma raridade em tempos de tanta grosseria. E a prof.a Fernanda agradeço por todo conhecimento adquirido e pelo prazer sentido em interagir com uma cientista tão focada e prática, que ânimo trabalhar com você!!! Do mesmo grupo de pesquisa, agradeço a doutoranda Renata Bicev, detentora das mesmas qualidades da orientadora. Obrigada por tudo!

A recém doutora formada Thaís Bento, toda a minha admiração! Obrigada por sempre levantar a bandeira da gerontologia, tu és meu exemplo de gerontóloga e pesquisadora!!

Um obrigado a todos (as) em que no período de graduação me deram forças para chegar até aqui, pessoal da sala (avante turma 2012!!), funcionários do bandeirão, equipe de limpeza e higienização (meu TOC de limpeza e organização agradece profundamente) e especialmente a equipe de segurança e guarda universitária da EACH! Exemplos de profissionais dedicados e simpáticos! Vocês são demais!

Clarino, você chegou aos dois minutos finais do segundo tempo, fez o gol da virada e animou toda a torcida. Melhor técnico de laboratório que já tivemos, prestativo e humano. Obrigada!

Agradeço a todas as funcionárias da Secretaria de pós-graduação Biotecnologia, tanto pelas suas excelências profissionais como pelos conselhos sinceros de vida acadêmica. Obrigada!!!

À equipe de labuta (por ordem alfabética) Ana, Daniéle e Fábio, desejo todo o sucesso do universo. Obrigada pessoal! Rafaela, desde o começo mostrou-se muito próxima a mim. Chorou e riu comigo. Assim como a minha dissertação de mestrado, amadureci muito por conta da sua pessoa. Espero que este espírito revolucionário de Joana D’Arc, porém meigo igual dos Ursinhos carinhosos continue vivo sempre! Lentes cor-de-rosa! Patrícia e Gabriel, muito obrigada! Os vossos conselhos e acolhimento foram essenciais para o meu amadurecimento e passagem por momentos difíceis. Jamais esquecerei.

Nelcy, não sei que seria da minha saúde mental e por fim, desta minha Jornada que durou quase uma trilogia de Senhor dos Anéis sem você. O seu profissionalismo é fora de série, e sinto em você os melhores sentimentos que alguém pode possuir! Que Deus abençoe sua vida sempre, assim como você me guia e conduz para um caminho de desenvolvimento. Deu-me a vara para pescar e ser feliz. Obrigada!!!!

Agradecimentos “amizadísticos”: Natani, companheira de aventuras e que da faculdade se tornou para a vida. Todo agradecimento é pouco. Assim como o sr. Vilmar, alegre, determinado, amigo presente e excelente profissional. E aos especiais Luiz e Mayara. Muitas histórias com todos vocês e sentimentos impossíveis de descrever.

A minha bixete querida Monica, que é tão querida que me falta o ar para agradecê-la! Seu semblante sereno e pleno me faz acreditar num mundo melhor.

Da época de colégio, como se esquecer da Ju? Sempre tão dedicada aos estudos, a vislumbra e sinto o mesmo até hoje! Mesmo sem saber, você sempre me inspirou muito aos estudos!

Para a *The Best Teacher* Lygia e as minhas queridas *classmates* Manu, *Sister* e *Mother*, desejo-lhes todas as bênçãos do Universo e o mais puro agradecimento. Saibam que o apoio dado por vocês foi essencial para eu chegar até aqui. Obrigada de coração!!

Em meio a chutes, socos e mordidas, agradecimentos especiais ao moço Gustavo. Por meio do seu jeito leve de viver a vida, atípico e otimista, consegui olhar a vida de outros ângulos e ser eu mesma ao mesmo tempo. A sensação de paz que sinto ao pensar em você me faz acreditar que tudo passará e o melhor sempre estará por vir. O mesmo sinto de sua família, portanto, um combo de agradecimentos!

A Marina, minha melhor amiga de anos a fio, sempre ao meu lado. Sempre. Todo agradecimento é pouco. E a sua família também, que sempre me faz sentir acolhida.

Agradeço a minha “amigas para sempre” Dulcinéia!! Não sei como esta amizade começou ao certo, mas sei que não irá acabar. Você chegou no momento certo. Te amo Dulci! Agradeço também a sua família maravilhosa!

Agradeço infinitamente a minha alma gêmea “Best”, melhor amiga de infância há quase 20 anos. Aquela irmã que o *Cosmos* permitiu que eu a escolhesse.

E por fim, agradecimentos sinceros ao prof. Ribamar, que desde o primeiro ano da minha graduação até hoje investe e acredita na minha capacidade como cientista. Ensinou-me, sobretudo, valores morais e éticos que jamais serão esquecidos.

E por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento destinado ao desenvolvimento desta pesquisa (Processo 17/09938-2).

“Apaixone-se pelo processo, e os resultados virão.” (Eric Thomas)

RESUMO

CAMANDONA, V.L. **Análise do efeito da superexpressão de HSP27 humana na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae***. 2018. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

INTRODUÇÃO: O envelhecimento populacional está em constante crescimento, sendo acompanhado por uma maior incidência de doenças crônicas e neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington. Sabe-se que parte destas doenças são causadas pelo acúmulo de proteínas mal-enoveladas, e estudos têm apontado que os componentes do sistema ubiquitina-proteassomo possuem um potencial alvo terapêutico para doenças relacionadas ao processo senil do envelhecimento. A chaperona molecular HSP27 é capaz de aumentar a atividade catalítica do proteassomo e a degradação de proteínas ubiquitinadas, além de atuar em situações nocivas para célula, como choque térmico e estresse oxidativo. Em vista disso, o presente projeto visou analisar o efeito da superexpressão de HSP27 humana, sob o controle de nove promotores mutantes TEF na longevidade de *S. cerevisiae*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os ensaios realizados envolveram a determinação da longevidade cronológica e replicativa, ensaio de termotolerância, resistência ao estresse oxidativo e determinação da atividade proteassomal de *S. cerevisiae*. **RESULTADOS:** Os resultados obtidos indicam que a superexpressão de HSP27 prolonga a longevidade replicativa e melhora a resistência celular contra choque térmico e estresse oxidativo, além de aumentar a atividade proteassomal. Contudo, essas melhorias só ocorreram em certos níveis de expressão de HSP27, sendo TEF8' o promotor mutante que conferiu os melhores resultados. **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:** Esses resultados sugerem que a função de HSP27 implica no conceito de hormese, em que níveis ideais puderam ser determinados em *S. cerevisiae*, e este fato poderá ser importante para interferir na longevidade, e corroborar para o futuro desenvolvimento de fármacos que poderiam controlar a expressão gênica da proteína e modular os fenótipos observados na senescência em humanos.

Palavras-chave: HSP27. Longevidade. *Saccharomyces cerevisiae*. Biologia molecular. Gerontologia.

ABSTRACT

CAMANDONA, V.L. **Analysis human HSP27 overexpression on the longevity of *Saccharomyces cerevisiae***. 2018. 91 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

INTRODUCTION: Population ageing is constantly increasing, accompanied by a higher incidence of chronic and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's. It is known that some of these diseases are caused by accumulation of unfolded proteins, and studies have pointed out that the components of the ubiquitin-proteasome system have a potentially therapeutic target for diseases related to the senile aging process. The molecular chaperone HSP27 is able to increase the catalytic activity of the proteasome and degradation of ubiquitinated proteins, besides acting in situations harmful to the cell, such as heat shock and oxidative stress. In view of this, the present study aimed to analyze the effect of overexpression of human HSP27, under the control of nine TEF mutant promoters on longevity of *S. cerevisiae*. **MATERIAL AND METHODS:** The assays involved the determination of chronological and replicative longevity, thermotolerance, resistance to oxidative stress and determination of proteasomal activity of *S. cerevisiae*. **RESULTS:** The results indicated that the overexpression of HSP27 prolongs a replicative longevity and improves the cellular resistance to heat shock and oxidative stress, besides increasing the proteasomal activity. However, these improvements only occurred at optimal levels of HSP27, wherein mutant promoter TEF8' obtained the best performance. **DISCUSSION AND CONCLUSIONS:** These results suggest that the function of HSP27 implies in the concept of hormesis, in which ideal levels could be determined in *S. cerevisiae*, and this fact may be important to interfere in the longevity, and corroborate for the future development of drugs that could control the expression of the protein and modulate the observed phenotypes in senescence in humans.

Key-words: HSP27. Longevity. *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology. Gerontology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Envelhecimento replicativo em levedura.....	23
Figura 2. Envelhecimento cronológico em levedura.....	24
Figura 3. Composição do proteassomo de mamíferos.....	29
Figura 4. Mecanismo de ação das <i>holdases</i> , <i>foldases</i> e disagregases.....	32
Figura 5. Esquema para ensaio de longevidade cronológica.....	52
Figura 6. Esquema de uma placa para ensaio de longevidade.....	54
Figura 7. Construção da biblioteca YIplac128-TEF-HSP27.....	57
Figura 8. Confirmação da ligação dos promotores TEF no fragmento do vetor integrativo YIplac128 contendo HSP27 humana.....	58
Figura 9. Coloração protéica com Ponceau S em <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 10. Análise da expressão HSP27 humana em <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 11. Análise da expressão de HSP27 humana em <i>S. cerevisiae</i>	62
Figura 12. Efeito da superexpressão de HSP27 sob controle do promotor TEF nativo na longevidade replicativa e cronológica em comparação a células selvagens (WT).....	63
Figura 13. Análise da longevidade replicativa e cronológica das células selvagens (WT) em comparação ao vetor.....	64
Figura 14. Efeito da superexpressão de HSP27 sob controle de 9 promotores mutantes TEF na longevidade replicativa em comparação ao vetor.....	65
Figura 15. Efeito da superexpressão de HSP27 sob controle de 9 promotores mutantes TEF na longevidade cronológica em comparação ao vetor.....	67
Figura 16. Atividade proteassomal em células que superexpressam HSP27 sob controle de 9 promotores mutantes TEF em comparação ao vetor.....	68
Figura 17. Ensaio de desafio com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em células que	

superexpressam HSP27 sob controle de 9 promotores mutantes TEF em 70
comparação ao vetor.....

Figura 18. Ensaio de choque térmico em células que superexpressam HSP27 sob
controle de 9 promotores mutantes TEF em comparação ao vetor..... 71

Figura 19. Diferentes níveis de expressão de HSP27 produzem resposta
hormética em ensaios fenotípicos e bioquímico..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. HSP de <i>S. cerevisiae</i>	36
Tabela 2. Chaperonas moleculares de seres humanos.....	40
Tabela 3. Condições da reação de amplificação de <i>HSP27</i> por PCR.....	49
Tabela 4. Oligos utilizados para amplificação do gene <i>HSP27</i>	49
Tabela 5. Renomeação dos promotores TEF mutantes por nível de expressão protéica	62
Tabela 6. Análises estatísticas dos experimentos de RLS. Valores de p foram avaliados pelo teste não- paramétrico Mann-Whitney comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.....	89
Tabela 7. Análises estatísticas dos experimentos de ensaio proteassomal. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF	89
Tabela 8. Análises estatísticas dos experimentos do ensaio de estresse oxidativo. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF	90
Tabela 9. Análises estatísticas dos experimentos do ensaio de choque térmico. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
× g	Aceleração da gravidade
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AMC	<i>7-amino-4-methylcoumarin</i>
ATM	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CLS	Longevidade cronológica
Cp.	Comprimento
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ER	Reticulo endoplasmático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Gramma
G₀	Fase estacionária
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HeLa	Henrietta Lacks
HSF1	<i>Heat shock factor 1</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>

HSPB	<i>Heat shock protein beta</i>
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere
Mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanometros
NaOH	Hidróxido de sódio
O.D.	Densidade óptica
P	Probabilidade de significância
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotação por minuto
RC	Restrição calórica
RLS	Longevidade replicativa
S	Segundos
S	Coefficiente de sedimentação svedberg

SDS-PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	<i>Synthetic dextrose complete</i>
sHSP	<i>Small heat shock protein</i>
Suc-LLVY-AMC	<i>N-Succinyl-Leucine-Leucine-Valine-Tyrosine</i>
SUP	Sistema ubiquitina proteassomo
T_m	Temperatura de melting
u.arb.	Unidade arbitrária
Ub	Ubiquitina
UFCs	Unidades formadoras de colônia
WT	Células selvagens
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
YPG	<i>Yeast Extract Peptone Glycerol</i>

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1 Organismos-modelo para o estudo dos mecanismos biológicos do envelhecimento	21
1.2 Envelhecimento em levedura.....	22
1.3 Longevidade replicativa	22
1.4 Longevidade cronológica.....	23
1.5 Uma etiologia comum para doenças neurodegenerativas	26
1.6 Mecanismos relacionados à homeostase proteolítica	26
1.7 Sistema ubiquitina proteassomo.....	27
1.8 O proteassomo	28
1.9 Envelhecimento e componentes da via ubiquitina-proteassomo	30
1.10 Chaperonas.....	31
1.10.1 Chaperoninas	32
1.10.2 Proteínas de choque térmico (HSP).....	33
1.11 Fatores de transcrição envolvidos na resposta ao choque térmico	34
1.11.1 Fatores responsivos ao estresse Msn2/4p	35
1.12 HSP de <i>S. cerevisiae</i>	36
1.13 Chaperonas moleculares de seres humanos.....	39
HSP40, GrpE, BAG, HSPBP1, Hip, CHIP, Hop	40
1.13.1 Proteínas de choque térmico de baixo peso molecular de seres humanos.....	40
1.14 HSP27.....	41
1.14.1 HSP27 e doenças	42
2. Justificativa.....	43
3.0 Objetivos	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4.0 Material e métodos	45
4.1 Linhagens	45
4.2 Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos	45
4.3 Meios e soluções	45

4.3.1	YPD	45
4.3.2	YPG	46
4.3.3	YNBD	46
4.3.4	SDC.....	46
4.4	Construção de plasmídeos e manipulação genética.....	48
4.4	Análise da expressão protéica por Western Blot.....	50
4.5.1	Análise de imagem e normalização de dados	51
4.6	Ensaio de longevidade cronológica	52
4.7	Ensaio de longevidade replicativa	53
4.8	Ensaio de termotolerância.....	54
4.9	Ensaio de resistência ao estresse oxidativo	54
4.10	Determinação da atividade peptidásica do proteassomo 20S	55
5.	Resultados.....	56
5.1	Clonagem dos promotores mutantes TEF no vetor YIplac128-TEFnat-HSP27.....	56
5.2	Quantificação protéica de HSP27	58
5.3	Análise da Longevidade replicativa e cronológica em células superexpressando <i>HSP27</i> sob controle do promotor TEF nativo	62
5.4	Análise da Longevidade replicativa em células superexpressando <i>HSP27</i> sob controle de nove promotores TEF mutantes	64
5.5	Análise da Longevidade cronológica em células superexpressando <i>HSP27</i> sob controle dos promotores TEF mutantes.....	65
5.6	Ensaio de atividade proteassomal em células superexpressando <i>HSP27</i> sob controle dos promotores TEF mutantes.....	67
5.7	Ensaio de estresse oxidativo e choque térmico em células superexpressando <i>HSP27</i> sob controle dos promotores TEF mutantes	68
6.	Discussão.....	71
7.	Conclusão	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO 1	86
	ANEXO 2	88

1. Introdução

O crescimento da população idosa, pessoas com 60 anos ou mais, em números absolutos e relativos, é um fenômeno mundial que está ocorrendo de forma sem precedentes. Em 1950, eram cerca de 204 milhões de idosos no mundo e a expectativa de vida mundial era de 48 anos, em 1998, quase cinco décadas depois, esse contingente alcançava 579 milhões de pessoas, um crescimento de quase oito milhões de pessoas idosas por ano (RILEY, 2005). Dados recentes comprovam que 7,4% da população brasileira é composta por idosos e a expectativa de vida atingiu 73,5 anos (IBGE, 2010). Segundo as projeções, em 2050, a população idosa do mundo será de 1,9 bilhões de pessoas (WHO, 2015). De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o período entre 1975 e 2025 é considerado como a “Era do Envelhecimento”, uma vez que a expectativa de vida da população alcançou uma idade jamais presenciada em anos anteriores – pelo menos não para um grande número de indivíduos. (SIQUEIRA; BOTELHO; COELHO, 2002).

Devido a essa nova conformação populacional, há um interesse crescente na área do envelhecimento, sendo notado por meio dos surgimentos de centros de estudos e da formação de profissionais para atender o público idoso, criação de áreas específicas voltadas para o estudo do processo do envelhecimento, além da abertura de espaços para discussões desta temática (NÉRI, 2004). Sendo assim, a responsabilidade de se aprofundar no assunto recai, principalmente, aos profissionais especializados nas áreas de gerontologia e geriatria, uma vez que são reconhecidos por promover cuidados especializados e humanizado aos idosos. Diversas são as formas para trabalhar o assunto, mas podemos ressaltar a investigação científica como um fator essencial para a produção de conhecimento e de novas descobertas acerca da temática do envelhecimento (FARFEL, 2008).

Esta transição demográfica será acompanhada por mudanças epidemiológicas, pois um dos principais fatores de risco para diversas doenças é a idade. Doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington, doenças cardiovasculares, metabólicas e neoplásicas aumentam sua prevalência nas faixas etárias mais longevas (LÖW, 2011; TSAKIRI; TROUGAKOS, 2015). Neste contexto, estudos direcionados ao entendimento dos mecanismos moleculares podem auxiliar na elucidação do processo de envelhecimento,

permitindo retardar o surgimento de diversas causas de morbidade em idosos, com origem nessas doenças.

1.1 Organismos-modelo para o estudo dos mecanismos biológicos do envelhecimento

O conhecimento científico sobre as causas do envelhecimento ainda é limitado, e por questões éticas, nem todas podem ser estudadas diretamente nos seres humanos, sendo necessário utilizar organismos-modelo. O envelhecimento tem sido estudado utilizando-se organismos-modelo como os roedores, a mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, o verme *Caenorhabditis elegans* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, dentre outros (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

A levedura *S. cerevisiae* tem contribuído de várias formas para a identificação de genes de mamíferos que afetam o envelhecimento, uma vez que apresenta características que torna vantajoso o seu uso. *S. cerevisiae* é um ótimo organismo-modelo por ter ciclo de vida curto, ser simples de cultivar e de fácil manipulação genética, contribuindo para o estudo dos danos no DNA e manutenção do genoma, bem como as suas contribuições para doenças que afetam o envelhecimento (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

S. cerevisiae está entre os organismos que possuem maior quantidade de informações em bancos de dados disponíveis, sendo o primeiro eucarioto a possuir sequência genômica totalmente sequenciada e disponibilizada na forma de base de dados (<http://www.yeastgenome.org/>) (GOFFEAU et al., 1996). Outro fato relevante é que leveduras e humanos possuem diversos genes ortólogos em comum, e muitas das vias metabólicas foram mantidas em ambos os organismos. Desta forma, podem ser realizados estudos da função de proteínas humanas que substituem seus ortólogos em levedura e genes que estão envolvidos em doenças, devido ao fato deste organismo-modelo ser uma célula eucariótica (PETRANOVIC; NIELSEN, 2008).

1.2 Envelhecimento em levedura

O potencial de abordagens de intervenção dirigidas ao envelhecimento ainda carece de informações, uma vez que o fenômeno do envelhecimento é um processo multifatorial. No entanto, nas últimas décadas notamos significativos avanços em pesquisas nesta área, na qual foram desenvolvidos dois modelos principais de ensaios em levedura para entender o envelhecimento, denominados como replicativo e cronológico. Ambos os ensaios foram projetados para fornecerem sistemas passíveis para auxiliarem no desenvolvimento de hipóteses a respeito do envelhecimento dos mamíferos e, pelo menos ao nível da identificação de genes conservados, eles parecem ter tido êxito em seus objetivos (LONGO et al., 2012).

1.3 Longevidade replicativa

Os ensaios de longevidade replicativa (RLS, do inglês “*Replicative Lifespan*”) são realizados há mais de 50 anos. O ensaio é conceitualmente simples e tira vantagem do fato de que as células de levedura dividem-se por brotamento assimétrico, produzindo uma célula-filha, sendo esta menor do que a matriz a partir do qual é derivada (célula-mãe). O grande achado para a longevidade replicativa é que as células não se replicam para sempre e em vez disso, param após um número limitado de divisões (varia de acordo com cada cepa) e entram em um estado pós-replicativo curto, seguido de lise (Figura 1). Nos últimos anos, a atenção se voltou para o entendimento de quais aspectos da longevidade replicativa são compartilhados, tanto em leveduras como em eucariotos multicelulares, incluindo mamíferos. Uma questão em torno de estudos de envelhecimento replicativo em leveduras envolve a escolha de condições de crescimento, o que pode ter efeitos importantes sobre o resultado experimental (LONGO et al., 2012). Para a grande maioria dos estudos de envelhecimento replicativo, o método de crescimento das leveduras é realizado em meio rico na presença de 2% de glicose ou quantidades inferiores que podem variar de 0,05% a 1% para ensaios em restrição calórica (WU et al., 2011).

Figura 1. Envelhecimento replicativo em levedura. A longevidade é determinada a partir de quantas células-filhas (D) uma célula-mãe (M) é capaz de produzir até morrer, ou seja, ser incapaz de brotar por mais de dois dias consecutivos.

A análise da longevidade replicativa é normalmente realizada por separação manual de células-filhas que brotam de uma única célula-mãe, usando um microscópio padrão de dissecação de tétrades, equipado com um micromanipulador (LONGO et al., 2012).

1.4 Longevidade cronológica

O ensaio de envelhecimento cronológico (CLS, do inglês “*Chronological Lifespan*”) assemelha-se a ensaios utilizados para medir o tempo de vida em eucariotos superiores (LONGO et al., 2012). O envelhecimento cronológico em leveduras é relativo ao tempo que uma população de células permanece viável, após atingir a fase estacionária (G_0), assim como está representado na Figura 2 (PARRELLA; LONGO, 2008). Ilse Müller e colaboradores, desenvolvedores deste tipo de ensaio, tinham como interesse investigar a correlação entre a passagem do tempo cronológico e o tempo de vida replicativo. A priori, não sabiam se os genes que determinavam a longevidade atuavam na capacidade reprodutiva ou se eles

fixavam a longevidade cronológica das células. Para determinar isto, estes pesquisadores realizaram três experimentos, nos quais controlavam o metabolismo celular (1) incubando as células a 10°C por várias horas; (2) fazendo uma pré-cultura das células em meios que inibem a divisão celular antes de permitir o crescimento logarítmico e, por último, (3) por cultura das células num meio que reduzisse a taxa de formação de brotos. Todos estes métodos conduziram a um prolongamento do tempo de vida cronológica, mas o tempo de vida medido pelo número de brotos permaneceu notavelmente constante. Portanto, para além de se estudar a longevidade somente do ponto de vista reprodutivo, percebeu-se que havia necessidade de desenvolver um método que aferisse a longevidade cronológica (MÜLLER et al., 1980).

Figura 2. Envelhecimento cronológico em levedura. A longevidade é determinada por meio de quanto tempo uma célula mantém-se viável no estado quiescente (G_0), sendo capaz de se proliferar formando colônias quando é fornecido um meio rico em nutrientes.

Experimentalmente, os organismos podem ser cultivados em meio sintético completo na presença de dextrose (SDC, do inglês “*Synthetic Dextrose Complete*”) assim como em meio rico (YPD, do inglês “*Yeast extract Peptone Dextrose*”) ou água, sendo mantidos na mesma cultura, até pelo menos 99,9% da população morrer (HUANG et al., 2013). O meio mais utilizado para este experimento é o SDC, que proporciona uma duração menor no tempo

de execução comparado aos outros meios, uma vez que as células sobrevivem um terço do tempo. Contudo, o experimento em água pode ser utilizado como uma forma de avaliar a sobrevivência sob condições de restrição calórica extrema, e também como estratégia para evitar que as células sobreviventes possam reentrar no ciclo celular usando os nutrientes remanescentes ou liberados de células mortas lisadas, fenômeno conhecido como GASP (do inglês, “*Growth Advantages in Stationary Phase*”), em que pode invalidar o experimento devido a modificações do meio extracelular. Sendo assim, neste método as células são lavadas três vezes com água a cada 2 dias para remover todos os nutrientes liberados pelas células mortas (HU et al., 2013).

Durante a fase de crescimento (cerca de 10h), a energia é produzida principalmente pelo metabolismo de fermentação da glicose. Quando a glicose é esgotada, a população muda para um metabolismo respiratório que utiliza, em parte, o etanol produzido durante a fase de crescimento (BRAUER et al., 2005; LONGO et al., 2012). A cultura de célula é mantida a 30°C em agitação, e a sua viabilidade é monitorada por meio da coleta de alíquotas de células em intervalos regulares e semeadura em placa contendo meio rico. A viabilidade é realizada geralmente por contagem do número de células capazes de formarem colônias (HUANG et al., 2013). Outro método desenvolvido para estudar o envelhecimento cronológico é o monitoramento da sobrevivência em meio sólido (“*in situ viability assay*”) na presença de todos os nutrientes contidos no meio padrão SDC, mas sem uma das marcas auxotróficas (aminoácidos) da cepa de levedura utilizada. Neste método, são semeadas aproximadamente 100 células em 10 placas no mesmo dia, e adiciona-se, a cada dois dias, em uma das placas, o aminoácido respectivo à marca auxotrófica, e contam-se as colônias após dois dias de incubação a 30°C. O ensaio é finalizado da mesma forma que os anteriores, quando 99,9% da população não é mais viável. (WEI et al., 2009).

Uma vantagem adicional do CLS é que assemelha-se as condições ambientais encontradas pelos micro-organismos no seu ambiente natural, onde sobrevivem como populações que não se dividem na presença de nutrientes externos limitados (PARRELLA; LONGO, 2008). Evidencia-se a importância e viabilidade de se utilizar leveduras como organismo-modelo para o estudo de fatores ligados à longevidade. *S. cerevisiae* também foi amplamente utilizada em experimentos relacionados a doenças neurodegenerativas que são preponderantes no envelhecimento (PETRANOVIC; NIELSEN, 2008).

1.5 Uma etiologia comum para doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas associadas ao processo de envelhecimento possuem inúmeras causas; contudo, falha no mecanismo de proteólise e seus componentes podem levar ao acúmulo de proteínas agregadas, e assim favorecer o desenvolvimento dessas doenças (MCKINNON; TABRIZI, 2014). Na doença de Alzheimer o acúmulo de agregados extracelulares do peptídeo β -amilóide $A\beta_{42}$ e intracelulares da proteína *Tau* hiperfosforilada levam à morte neuronal (FERNANDEZ et al., 2014; LEWIS et al., 2001). O mesmo tipo de evento ocorre na doença de Parkinson, pela formação de corpúsculos de Lewy, constituídos de agregados da proteína α -sinucleína (COMPTA et al., 2011; POLYMERPOULOS et al., 1997). Na doença de Huntington há presença de aglomerados da proteína huntingtina, devido ao processamento do N-terminal desta proteína rica em poliglutamina, que leva à disfunção mitocondrial (BARRIENTOS et al., 2006), acúmulo nuclear e à neurodegeneração (MACDONALD et al., 1993). Em um organismo saudável, a frequência em que ocorre estes eventos dentro das células não é inexistente, mas é baixa. Contudo, se os componentes da via de degradação de proteínas são prejudicados, há um comprometimento celular devido à formação dos agregados que leva às doenças supracitadas (GADHAVE et al., 2016).

1.6 Mecanismos relacionados à homeostase proteolítica

As proteínas estão sujeitas a mudanças conformacionais e estruturais em resposta à ação de vários estímulos estressores e, fazendo com que adquiram uma estrutura deformada não funcional. Ao longo da evolução, as células desenvolveram três mecanismos de reparo e degradação intracelulares, capazes de suprimir este problema: (i) resposta a proteínas desenoveladas, a qual propicia a reorganização da conformação da proteína, (ii) autofagia, responsável pela degradação de organelas, e (iii) sistema ubiquitina-proteassomo (SUP), especializado em eliminar proteínas mal-enoveladas. Todos estes mecanismos contribuem para o controle de qualidade das proteínas e manutenção da homeostase proteolítica (MCKINNON; TABRIZI, 2014).

1.7 Sistema ubiquitina proteassomo

Um mecanismo que contribui para a proteção celular sob estímulos estressores, por meio da eliminação de proteínas mal enoveladas, é a via de degradação ubiquitina-proteassomo. O mecanismo da ubiquitinação requer (1) a cooperação de uma série de enzimas, incluindo enzimas ativadoras de ubiquitina; (2) uma família de enzimas conjugadoras de ubiquitina; e (3) certo número de ligases de ubiquitina; cada uma das quais reconhece uma ou mais proteínas do substrato. A ubiquitinação, a liberação de ubiquitina da proteína alvo e o mecanismo de degradação da proteína pelo proteassomo são todos processos que consomem energia (WEISSMAN, 2001).

A ubiquitina é altamente conservada evolutivamente e possui 76 resíduos de aminoácidos (THROWER et al., 2000). O processo de ubiquitinação é iniciado pela enzima ativadora de ubiquitina E1, a partir do momento que esta se liga a uma ubiquitina hidrolisando ATP. A porção ubiquitinada é transferida para E2, enzima conjugadora de ubiquitina, que facilita a ligação da molécula ubiquitina na proteína pela enzima ubiquitina ligase E3. A adição sucessiva de ubiquitinas na proteína forma uma cadeia de poliubiquitinas capaz de ser reconhecida pelo proteassomo (DICK et al., 1998). A molécula de ubiquitina marca as proteínas anormais para destruição da seguinte maneira: uma molécula de ubiquitina se liga a um resíduo de lisina da proteína a ser degradada e outras moléculas de ubiquitina se prendem à primeira, formando-se um complexo que é reconhecido pela partícula reguladora do proteassomo; a proteína é desenrolada pela ATPase, usando energia de ATP, e introduzida no proteassomo, onde é quebrada em oligopeptídeos (peptídeos com cerca de oito aminoácidos cada um). Esses peptídeos são devolvidos ao citosol. As moléculas de ubiquitina que participaram do processo são liberadas pelas partículas reguladoras, para serem usadas novamente. Os peptídeos com oito aminoácidos podem ser degradados por enzimas do citosol ou podem ter outros destinos; por exemplo, em algumas células eles participam da resposta imune (KNECHT et al., 2009).

1.8 O proteassomo

O proteassomo é um complexo protéico de alta massa molecular – 2000 kDa, característica que lhe conferiu sua denominação (do inglês, “*proteasome*”: “*protea*” de protease e “*some*” de soma, partícula) (ARRIGO et al., 1988). O proteassomo tem a forma de um barril constituído por quatro anéis sobrepostos. Cada extremidade do barril tem uma partícula reguladora, como se fosse uma tampa. Essa partícula reguladora tem atividade ATPase e reconhece as proteínas ligadas à ubiquitina (TANAKA, 2009).

Estruturalmente, o proteassomo como um todo é denominado partícula 26S, a qual é composta por um núcleo de protease 20S autocompartimentado, limitado a uma ou ambas as extremidades pela partícula regulatória 19S, denominada como tampa, conhecido como PA700 em células animais, assim como mostra-se ilustrado na Figura 3 (VERMA et al., 2000). O núcleo 20S é caracterizado como centro catalítico do proteassomo, e é composto por quatro anéis alternados heptaméricos, sendo dois anéis externos do tipo α e dois anéis internos do tipo β , resultando na configuração α - β - β - α . Em células eucarióticas o proteassomo 20S é composto por 14 subunidades distintas, com pesos moleculares que variam de 22 a 34 kDa, representado por sete subunidades do tipo α (α 1- α 7), assim como do tipo β (β 1- β 7). A subunidade 19S compreende duas subestruturas. A primeira delas é a base, composta de seis ATPases e duas subunidades não-ATPases. A segunda é a tampa, que contém até dez subunidades não-ATPases e é responsável pela ligação do substrato (TANAKA, 2009).

A degradação protéica pelo proteassomo inicia-se pela abertura da câmara catalítica regulada pelos anéis externos do tipo α e conseqüentemente a entrada do substrato. O núcleo 20S é caracterizado como uma protease multicatalítica, composta por 3 subunidades tipo β , conferindo-lhes atividades catalíticas diferentes entre si, sendo responsáveis pela hidrólise dos substratos. As subunidades β 1 contém atividade tipo caspase e clivam ligações preferencialmente de resíduos ácidos; as subunidades β 2 apresentam atividade tipo tripsina e clivam ligações de resíduos básicos; e as subunidades β 5 possuem atividade tipo quimiotripsina, clivando ligações de resíduos hidrofóbicos (FAROUT et al., 2000).

Figura 3. Composição do proteassomo de mamíferos. O proteassomo 26S consiste de um núcleo 20S composto por 28 subunidades (14 diferentes), de peso molecular 21-31 kDa, que são dispostas como quatro anéis alternados heptaméricos. Os dois anéis exteriores contêm subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, verde), amino terminais dos quais se projetam para dentro da abertura central do cilindro, como mostrado por difração de raios-X da estrutura proteassomal de leveduras. Os dois anéis internos contêm duas cópias de subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 7$, azul e vermelho), três dos quais ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$; vermelho) abrigam os seis sítios ativos. A subunidade 19S compreende duas subestruturas. A base, que está associada aos dois anéis α , é composta de seis ATPases (rosa) e duas subunidades não-ATPases (laranja). A tampa, que contém até dez subunidades não-ATPases (laranja), é responsável pela ligação do substrato e tem sua função reguladora pouco compreendida (Adaptado de Klotzel, 2001).

Com frequência, proteínas, tais como as que agem na regulação do metabolismo, precisam ser degradadas para assegurar que a resposta metabólica a um único estímulo não seja prolongada. As proteínas que foram desnaturadas, danificadas ou malformadas precisam ser eliminadas. E em função deste contexto, a função do proteassomo é digerir proteínas assinaladas (também denominadas como marcadas) para destruição pela união com ubiquitina. A degradação de proteínas é necessária para remover excessos de enzimas e outras proteínas, quando elas, após exercerem suas funções normais, tornam-se inúteis para a célula. Portanto, os proteassomos se fazem necessários para garantir a homeostasia celular, fazendo parte do sistema ubiquitina-proteassomo (TANAKA; MIZUSHIMA; SAEKI, 2012)

1.9 Envelhecimento e componentes da via ubiquitina-proteassomo

O complexo do proteassomo é bem regulado e envolvido em várias funções, como o ciclo celular, transmissão de sinal, regulação da transcrição, resposta ao estresse, diferenciação celular e adaptação metabólica. Contudo,

a atividade do proteassomo diminui com o envelhecimento, causando menor degradação de proteínas oxidadas e aumento na agregação de proteínas. Isso induz a degeneração celular e oferece as condições que levam a diversas doenças (CHONDROGIANNI et al., 2014), particularmente, aquelas relacionadas ao envelhecimento citadas anteriormente (Alzheimer, Parkinson e Huntington), resultantes do acúmulo de proteínas ubiquitinadas, oxidadas e agregadas. Junto a isso, a diminuição da atividade proteassomal leva à senescência celular em mamíferos (GAN et al., 2010). Estes achados sugerem que SUP e seus componentes são um potencial alvo terapêutico para essas doenças relacionadas especialmente ao processo senil do envelhecimento (GAN et al., 2010).

Além da possibilidade de modulação da atividade proteassomal com pequenas moléculas (fármacos) (CRAWFORD; WALKER; IRVINE, 2011), também existem mecanismos pelos quais é possível aumentar o desempenho do proteassomo. Um deles envolve a resposta que lida com o desdobramento parcial das proteínas celulares. Essa resposta é mediada por chaperonas que atuam no enovelamento de proteínas nascentes ou em cadeias polipeptídicas mal-enoveladas. As chaperonas são essenciais para a homeostase proteolítica celular e aumento da eficiência da ação do SUP (VOS et al., 2016).

1.10 Chaperonas

Quando uma proteína está desenovelada (o que ocorre em determinadas fases de sua síntese e transporte entre organelas), agregações indevidas podem existir, levando à perda da função destes polipeptídeos. As chaperonas atuam evitando tais interações aleatórias, até que o término do processo de enovelamento ocorra e a proteína adquira sua conformação nativa. A fim de evitar esta agregação, quando as proteínas estão desenoveladas, as chaperonas protegem as superfícies interativas ligando-se a elas e facilitam o enovelamento de polipeptídeos nascentes ou desenovelados. Em outros casos, a ligação de chaperonas a superfícies interativas de proteínas completamente enoveladas é parte crucial de sua regulação (VERGHESE et al., 2012).

As chaperonas possuem duas famílias gerais denominadas de chaperonas moleculares, as quais fazem parte às HSP (do inglês, “*heat shock protein*”) e a segunda família são representadas pelas chaperoninas. As chaperonas moleculares se ligam a segmentos do substrato e estabilizam proteínas desnaturadas ou parcialmente enoveladas, evitando que essas proteínas se agreguem e sejam degradadas. Enquanto que as chaperoninas formam câmaras de enovelamento dentro das quais proteínas desnaturadas, ou partes das mesmas, possam ser sequestradas, fornecendo-lhes tempo e ambiente adequado ao enovelamento apropriado. Embora o termo HSP seja comumente usado de forma sinônima a chaperona, devidas distinções devem ser feitas, pois nem todas as chaperonas são induzidas por choque térmico (VERGHESE et al., 2012).

Há três outras formas de distinguir e agrupar as chaperonas moleculares de acordo com as suas funções (Figura 4), que são: (i) *holdases*, dedicadas a reconhecer, ligar e estabilizar polipeptídeos parcialmente ou totalmente desenovelados, com o intuito de evitar sua agregação. Em geral são chaperonas ATP-independentes e possuem a função de conduzir a proteína cliente até uma chaperona *foldase*, até que a condição ambiental celular retorne ao normal; (ii) *foldases* possuem um ou mais domínios ligantes ao ATP e atuam no enovelamento protéico usando a energia provida pela hidrólise de ATP; (iii) e por fim, as disagregases também hidrolisam ATP para desagregar polipeptídeos que estão agregados, porém transferem a proteína cliente parcialmente desenovelada para *holdases* e/ou *foldases* - as quais possuem a função de finalizar o processo de enovelamento protéico e aquisição de

sua conformação nativa (DOYLE; GENEST; WICKNER, 2013; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Figura 4. Mecanismo de ação das *holdases*, *foldases* e *disagregases*. a) As HSP classificadas como *holdases* ligam-se à proteína cliente, de maneira independente de ATP, e a estabilizam para que as *foldases* realizem sua função de reenovelamento, utilizando-se ATP. b) Quando ocorre agregação de proteínas desenoveladas na célula, as disagregases separaram os agregados e entrega-os às *holdases* e *foldases*, para que o processo de aquisição do estado nativo da proteína alvo seja finalizado. c) As *holdases* também podem atuar no tamponamento de proteínas mal enoveladas, evitando agregações irreversíveis das mesmas. d) Estas chaperonas moleculares estão envolvidas no sistema de degradação protéica, por meio da entrega das proteínas mal enoveladas ao proteassomo (CARRA et al., 2017; DOYLE; GENEST; WICKNER, 2013; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

1.10.1 Chaperoninas

Assim como as chaperonas, as chaperoninas são responsáveis pela proteção e enovelamento de proteínas total ou parcialmente desenoveladas. Elas também são conhecidas por interagir com outras famílias de chaperonas no enovelamento de substratos específicos. Contudo, as chaperoninas se diferenciam por formar estruturas semelhantes a um barril, que enovelam as proteínas dentro de sua cavidade central e de uma maneira dependente de

nucleotídeos. Existem duas classes principais de chaperoninas que foram conservadas ao longo da evolução, nomeadas de grupo I e II. O grupo I inclui GroEL de *Escherichia coli*, que é conservado entre procariotos e organelas eucarióticas endossimbióticas. As chaperoninas do grupo II são encontradas em eucariotos e arqueas. As estruturas gerais dos dois grupos são semelhantes, com apenas duas diferenças. As chaperoninas do grupo I são homomultímeros, enquanto há uma montagem hetero-oligomérica no grupo II. A segunda diferença está na estrutura da tampa, já que no grupo I a tampa é uma proteína separada chamada GroES, enquanto que no grupo II, a tampa é uma extensão flexível anexada de cada subunidade que, uma vez montada, se fecha sobre a cavidade central (CARRASCOSA; LLORCA; VALPUESTA, 2001).

1.10.2 Proteínas de choque térmico (HSP)

Até o presente momento, mais de 60.000 trabalhos científicos foram publicados a respeito das HSP, e da resposta ao choque térmico, ou HSR (do inglês. “*Heat Shock Response*”). A sua descoberta ocorreu em 1962, em um experimento no qual a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* ao calor, dinitrofenol ou salicilatos produziu o surgimento, em cromossomos, de um novo padrão de espessamento, que representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas. O estresse térmico ou químico induzia a expressão de genes, até então quiescentes, os quais faziam com que as células estressadas fabricassem grande quantidade de uma determinada classe de proteínas, derivando o nome de *heat shock proteins* (HSP), ou proteínas de choque térmico.

As HSP são uma classe de proteínas altamente conservadas, de procariotos a humanos, o que é um indício de sua grande importância ao longo da evolução (MEYER; SILVA, 1999). E dentre as HSP existentes há uma subclasse denominada de sHSP (do inglês, “*small heat shock proteins*”), caracterizadas pelo seu baixo peso molecular (15 a 40kDa) e por compartilharem um domínio α -cristalino (também conhecido como Hsp20), variando apenas o domínio N-terminal e C-terminal de suas estruturas (CARRA et al., 2017; HASLBECK; VIERLING, 2015).

As HSP podem ser agrupadas em famílias, de acordo com suas sequências de aminoácidos e pesos moleculares, em kDa. A família HSP70 é a mais conservada

filogeneticamente; sendo que a sua estrutura em humanos é 72% homóloga em relação às HSP70 de *D. melanogaster* (JÄÄTTELÄ; WISSING, 1992).

1.11 Fatores de transcrição envolvidos na resposta ao choque térmico

As proteínas HSF (do inglês, “*heat shock factor*”) e seus elementos da resposta ao choque térmico (HSE) cognatos são fundamentalmente conservados em sua estrutura e função de leveduras a humanos. Estudos demonstraram que células de levedura sem *HSF1* apresentaram defeitos relacionados à viabilidade celular, porém quando clonado *HSF1* ou *HSF2* de células de mamíferos, houve um resgate dos fenótipos (BONNER; BALLOU; FACKENTHAL, 1994). Os produtos de muitos genes alvo de HSF são conhecidos ou previstos para funcionar em uma ampla gama de processos celulares como, por exemplo, chaperonas, processo de ubiquitinação e proteólise, transporte vesicular, manutenção da parede celular e citoesqueleto, transporte de pequenas moléculas, metabolismo de carboidratos, geração de energia, transdução de sinal e mecanismos de defesa ao estresse oxidativo (HAHN et al., 2004).

Na maioria dos eucariotos, o aumento de expressão de HSP em uma célula estressada é mediado principalmente por HSF. Vertebrados e plantas evoluíram uma família de quatro membros de HSF, denominados de HSF1 a HSF4. Entre estas quatro HSF diferentes, a HSF1 desempenha um papel primordial na regulação transcricional da expressão de HSP. Já em leveduras e outros invertebrados, há expressão de um único HSF com equivalência funcional ao *HSF1*. O *HSF1* de levedura é um gene essencial de cópia única que codifica uma proteína de 833 aminoácidos (SORGER; PELHAM, 1988; WIEDERRECHT; SETO; PARKER, 1988).

A arquitetura fundamental de Hsf1p de levedura é consistente com todas as isoformas de HSF, incluindo um domínio de ligação ao DNA, repetições de três leucinas responsáveis pela trimerização do fator e um domínio de transativação carboxi-terminal. A Hsf1p de levedura é a única que possui um domínio adicional de ativação transcricional na região amino terminal (domínio de transativação N-terminal) (NIETO-SOTELO et al., 1990). Em *S. cerevisiae*, *HSF1* é essencial para a viabilidade celular em todas as temperaturas e por conta

disso é constitutivamente ligado aos promotores de genes HSP como um trímero, mesmo na ausência de estresse (SORGER; LEWIS; PELHAM, 1997). O regulon de Hsf1p inclui aproximadamente 165 genes, logo, o número de genes relacionados à Hsf1p representam 3% dos genes totais em leveduras (HAHN et al., 2004). Além de Hsf1p, em *S. cerevisiae*, a resposta ao choque térmico é regida pela ação de outros dois fatores de transcrição denominados Msn2/4p (GASCH et al., 2000).

1.11.1 Fatores responsivos ao estresse Msn2/4p

Além da transcrição dos genes de choque térmico mediada por Hsf1p, uma via paralela em *S. cerevisiae* detecta e responde a uma variedade notável de estresses que inclui o aumento de temperatura. Os fatores reguladores desta via de estresse geral são Msn2p e Msn4p, dois fatores de transcrição funcionalmente relacionados, que medeiam a expressão de genes que atuam em condições de estresse na célula (SCHMITT; MCENTEE, 1996). Msn4p tem 41% de identidade na sequência de aminoácidos se comparado a Msn2p. A deleção de *MSN2* e *MSN4* leva à sensibilidade a estresse térmico, oxidativo e osmótico (ESTRUCH; CARLSON, 1993; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996).

Entretanto, *MSN2* parece desempenhar um papel mais relevante à célula, uma vez que a superexpressão de *MSN4* é capaz de restaurar apenas parcialmente a ativação transcricional de genes regulados por STRE (do inglês, “*stress-responsive element*”) em células *msn2Δ* mutantes (SCHMITT; MCENTEE, 1996). Análises genéticas de células *msn2Δ*, *msn4Δ*, e duplo mutante *msn2Δ msn4Δ* revelaram que, embora Msn2p e Msn4p exibam redundância funcional, também podem desempenhar papéis distintos na regulação da expressão de genes induzidos pelo estresse (TREGER et al., 1998). Análises de *microarrays* realizadas em células de *S. cerevisiae* constataram que a expressão de *MSN2* é constitutiva em todas as condições, enquanto que a expressão do gene *MSN4* ocorre apenas em situações de estresse e sua indução pode ser tanto autorregulável como dependente de Msn2p (GASCH et al., 2000).

1.12 HSP de *S. cerevisiae*

As chaperonas moleculares são um grupo ubíquo de proteínas, por estarem presentes em vários compartimentos celulares distintos, e estão envolvidas no enovelamento de outras proteínas (ELLIS, 1987). As HSP existentes de *S. cerevisiae* estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. HSP de *S. cerevisiae*

Classe	Funções	Localização
Hsp100	Reenovelamento e disagregase	Citoplasma
	Reenovelamento e disagregase	Mitocôndria
Hsp90	Maturação protéica. É induzível por estresse	Citoplasma
Hsp110	Troca de nucleotídeos de Hsp70, substrato de ligação, induzível sob condições de estresse	Citoplasma
Hsp70	Enovelamento protéico, translocação	Mitocôndria
Hsp40/J protein	Ativador ATPase de Hsp70, substrato de ligação	Citoplasma
Hsp60	Enovelamento proteico, translocação	Mitocôndria
Hsp10	Parceira de Hsp60, enovelamento proteico e translocação	Mitocôndria
Hsp42	Antiagregase	Citoplasma
Hsp26	Antiagregase	Citoplasma
Hsp12	Chaperona de membrana (?)	Citoplasma
Calnexina	Enovelamento de proteínas glicosiladas	ER
Proteína dissulfeto isomerase	Enovelamento protéico, dissulfeto redox química	ER

Adaptado de Morano, et al (2012).

Nota-se que as chaperonas moleculares descritas na tabela acima diferenciam-se quanto a sua localização celular. As HSP podem residir em organelas celulares como o retículo endoplasmático (ER) e as mitocôndrias, sendo fisicamente separadas do citossol por

membranas de fosfolípidos e, portanto, são protegidas dos elementos de controle de qualidade protéica citosólica. Quase todas as proteínas mitocondriais e todas as proteínas do ER são sintetizadas no citosol e entregues a esses compartimentos por vários caminhos de translocação. O lúmen do ER tem um ambiente de enovelamento único em comparação com o citosol, e proteínas no ER estão sujeitas a tais modificações como a formação de pontes de dissulfeto e a adição de oligossacárideos pré-montados, ambos os quais requerem o seu próprio repertório de chaperonas moleculares específicos presentes no ER (BERNALES; PAPA; WALTER, 2006).

A expressão de muitas dessas chaperonas organelares são reguladas por vias específicas de resposta ao estresse, sendo resposta à proteína desenovelada (UPR, do inglês, “*unfolded protein response*”) para o ER e a chamada sinalização retrógrada para as mitocôndrias (BERNALES; PAPA; WALTER, 2006). Devido ao fato de que a maioria das proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo celular e sintetizadas no ribossomo, as mitocôndrias possuem uma maquinaria dedicada a auxiliar na importação destas proteínas. Os complexos TIM e TOM são capazes de identificar e efetuar o transporte das proteínas alvo do citoplasma para a mitocôndria, porque identificam uma sequência sinal de reconhecimento N-terminal. Contudo, estas proteínas permanecem em um estado desenovelado para poderem ser translocadas, e por conta disso, as mitocôndrias possuem sistemas de acompanhamento composto por chaperonas, em que sua função é atuar no reenovelamento proteico (BECKER; BÖTTINGER; PFANNER, 2012).

1.12.1 Proteínas de choque térmico de baixo peso molecular de *S. cerevisiae*

As sHSP desempenham um papel vital na promoção da solubilidade protéica quando o calor ou outros estresses ambientais levam ao mal enovelamento geral da proteína (JAKOB et al., 1993). Em levedura, existem três tipos de sHSP, sendo elas Hsp26p e Hsp42p, com a função de se unirem a proteínas desenoveladas, impedindo sua agregação (CASHIKAR; DUENNWALD; LINDQUIST, 2005) e Hsp12p, a qual ainda não está bem caracterizada, mas acredita-se que também desempenha um papel na tolerância ao estresse térmico (WELKER et al., 2010).

Hsp26p existe em duas formas principais *in vivo*: (1) um grande multímero, composto por 24 monômeros em condições normais, que se dissocia em (2) dímeros na presença de temperaturas elevadas, sendo este um processo reversível. Hsp26p compartilha uma homologia de sequência significativa com o domínio α -cristalino, e em todos os organismos estudados, as sHSP compartilham um domínio C-terminal conservado, mas variam no domínio N-terminal, que possui de 12 a 40 kDa, tornando-a a classe mais divergente de chaperonas. Em *S. cerevisiae*, *HSP26* não é essencial e não exibe fenótipos após sua eliminação (HASLBECK et al., 1999; STROMER et al., 2003). No entanto, a deleção simultânea de outra sHSP, *HSP42*, resulta em um aumento de 200% em níveis de proteínas insolúveis a 30°C em comparação a células de tipo selvagem (HASLBECK et al., 2004a).

A proteína Hsp42p possui 43 kDa e suas formas oligoméricas apresentam de 12 a 16 subunidades (em concentrações mais baixas) e de 24 a 26 subunidades em concentrações mais elevadas. A sua estrutura também compartilha homologia dentro do domínio conservado C-terminal α -cristalino, mas possui um domínio N-terminal atipicamente longo que não possui semelhança de sequência com outras sHSP. Ambas Hsp26p e Hsp42p são pouco expressas durante o crescimento exponencial. Contudo, em conjunto, essas duas proteínas compreendem aproximadamente 1% de proteínas celulares existentes em condições de choque térmico, sendo que há 10 vezes mais Hsp42p do que Hsp26p, sugerindo que pode ser a sHSP dominante em células de *S. cerevisiae* termicamente estressadas. Apesar disso, esta sHSP é pouco estudada e, portanto, poucos dados a seu respeito são encontrados na literatura (HASLBECK et al., 2004b).

Hsp12p exibe baixa homologia de sequência para a superfamília de sHSP e é estrutural e funcionalmente distinta, porque parece existir exclusivamente como um monômero. Como as demais sHSP, Hsp12p é superexpressa em células na fase exponencial, mas são altamente induzidas (100 vezes) durante a fase estacionária e choque térmico. Na fase estacionária, Hsp12p compreende 2,4% das proteínas celulares totais (WELKER et al., 2010). Hsp12p não é essencial para o crescimento em condições normais ou de estresse, mas pode desempenhar um papel na barotolerância (proteção contra dessecação) (MOTSHWENE et al., 2004). Hsp12p está localizada tanto no citosol como nas membranas celulares. De acordo com esta observação, estudos recentes revelaram que Hsp12p atua na estabilização das membranas sob condições de estresse, modulando a sua fluidez. Essas características sugerem um diferencial de Hsp12p se comparada a outras HSP, por atuar mais fortemente como uma chaperona de membrana (WELKER et al., 2010).

1.13 Chaperonas moleculares de seres humanos

As famílias de chaperonas moleculares são classificadas de acordo com a massa molecular de seus respectivos monômeros, embora a maioria destas organizam-se na célula em forma de oligômeros. Em seres humanos, as chaperonas mais estudadas são HSP27, HSP40, HSP70 e HSP90. As chaperonas são classificadas de acordo com a localização celular, função e padrão de expressão, e a maioria são assistidas por co-chaperonas (Tabela 2) (CALDERWOOD; MURSHID; PRINCE, 2009).

Tabela 2. Chaperonas moleculares de seres humanos

Proteína	Localização	Função	Proteínas e co-chaperonas associadas
HSP60	Citosol, mitocôndria	Chaperonina	HSP10
HSP70	Citosol, núcleo, ER e mitocôndria	Chaperona molecular	HSP40, GrpE, BAG. HSPBP1, Hip, CHIP, Hop
HSP90	Citosol, ER	Chaperona molecular	p23, HOP, FKBP51, FKBP52, Cyp40, Cdc37, p97
HSP100	Citosol	Chaperona molecular	HSP70

Adaptado de CALDERWOOD; MURSHID; PRINCE, 2009; IKWEGBUE et al., 2018; TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011.

1.13.1 Proteínas de choque térmico de baixo peso molecular de seres humanos

O genoma de seres humanos codifica 10 diferentes membros da família das sHSP, nomeadas de HSPB1 a HSPB10. Estas pequenas proteínas de choque térmico apresentam de 150 a 250 aminoácidos. Embora as HSPBs variarem em sequências e tamanhos, todas apresentam similaridade estrutural, conservada a uma estrutura de folhas β -pregueadas denominada domínio α -cristalino, contendo, aproximadamente, 90 resíduos de aminoácidos (BARANOVA et al., 2009).

O presente projeto irá focar-se apenas em HSP27, também conhecida como proteína de choque térmico beta-1 (HSPB1), sendo em humanos codificada pelo gene *HSPB1* (CARPER; ROCHELEAU; STORM, 1990). HSP27 está associada com a regulação da atividade proteassomal (GAN et al., 2010). E, diferentemente de outras proteínas de choque térmico como HSP70 e HSP90, HSP27 possui alta habilidade de associar-se à ubiquitina (PARCELLIER et al., 2006).

1.14 HSP27

HSP27 é uma pequena proteína de choque térmico, composta por 205 aminoácidos (CARPER; ROCHELEAU; STORM, 1990). A sua indução compreende diferentes fatores de estresse como, por exemplo, choque térmico, estresse oxidativo e fármacos quimioterápicos, auxiliando as células a lidar com estímulos que seriam letais (PARCELLIER et al., 2006). Hickey e colaboradores (1986) clonaram um DNA complementar (cDNA) que codifica *HSP27* em células HeLa. Esse cDNA foi utilizado para identificar, em uma biblioteca genômica, a sequência de DNA de *HSP27* no genoma humano. Mediante a análise de híbridos de células somáticas, McGuire e colaboradores (1989) localizaram *HSP27* no cromossomo 7q11.23.

HSP27 está localizada principalmente no citosol (HINO et al., 2000), mas também na região perinuclear e núcleo (VOS; KANON; KAMPINGA, 2009). Em relação a sua expressão, HSP27 é encontrada em todos os tecidos humanos, sendo mais prevalente em tecidos cardíacos, músculo estriado e liso (KATOS et al., 1992). Aproximadamente, 20% dos resíduos de seus aminoácidos podem ser fosforilados, sendo um processo fundamental para o desempenho de algumas atividades na célula (ROGALLA et al., 1999). Dentre suas funções, foi constatado que HSP27 participa do processo de homeostase redox, regulação do citoesqueleto (ARRIGO et al., 2002), termotolerância (MARIN-VINADER et al., 2006), apoptose, desenvolvimento celular e atua como chaperona, favorecendo a degradação proteassomal de certas proteínas (BRUEY et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2002). Nota-se que HSP27 é superexpressa durante os diferentes estágios de diferenciação e desenvolvimento celular, sugerindo que possua um papel essencial na diferenciação dos tecidos (SARTO; BINZ; MOCARELLI, 2000). Em relação à apoptose, sugere-se que HSP27 possui efeitos antiapoptóticos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a regulação negativa da morte celular programada mediada por HSP27. Esta pequena HSP interage especificadamente com citocromo c quando realocado da mitocôndria para o citosol, evitando, assim, a formação do apoptosomo. Além disso, experimentos com HSP27 demonstraram que esta foi capaz de degradar p27^{kip1}, proteína cujo acúmulo leva à inibição do ciclo celular, seguida de apoptose (PARCELLIER et al., 2003, 2006).

1.14.1 HSP27 e doenças

Como os demais genes, *HSPB1* pode ser alvo de mutações e implicar no desenvolvimento de doenças. Mutações no domínio α -cristalino da proteína HSP27 estão relacionadas à neuropatia motora distal hereditária e a doença de Charcot-Marie-Tooth, ambas são doenças congênitas que acometem distúrbios neuromotores (ALMEIDA-SOUZA et al., 2010).

Recentemente, o provável papel de HSP27 no desenvolvimento de diferentes doenças tem sido descrito por inúmeros artigos; em especial, o papel relacionado a doenças neurodegenerativas, uma vez que estas são causadas, na maioria das vezes, por proteínas que se agregam, por estarem em sua conformação mal-enovelada (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011). Em vários estudos, constatou-se que a superexpressão de HSP27 aumenta a atividade catalítica do proteassomo e a degradação de proteínas ubiquitinadas em resposta a estímulos estressores. (GAN et al., 2010; PARCELLIER et al., 2006).

A partir disto, entende-se que HSP27 é capaz de indexar ao proteassomo proteínas nesta forma. Isto ocorre tanto na doença de Alzheimer, por formação de agregados da proteína β -amilóide, quanto pelos agregados de α -sinucleína, presentes na doença de Parkinson - ambas as proteínas (β -amilóide e α -sinucleína) são degradadas pelo proteassomo por ação de HSP27 (OUTEIRO et al., 2006). Contudo, em vez de prevenir a agregação de proteínas, na doença de Huntington, HSP27 atua na homeostase redox, reduzindo os níveis de espécies reativas a oxigênio na célula (PARASKEVAKOU et al., 2007). Todas estas ações culminam no aumento da sobrevivência neuronal e afirmam seus efeitos protetores para a célula; portanto, pressupõe-se que HSP27 possua a capacidade de prevenir doenças (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011).

Contudo, apesar dos efeitos benéficos que HSP27 oferece para as células no contexto das doenças citadas acima, HSP27 também está relacionada ao desenvolvimento de cânceres. Devido às propriedades inerentes desta proteína (prevenir acúmulo de proteínas agregadas, modulação do estado redox celular, citoesqueleto) e principalmente, por suas funções que levam a efeitos anti-apoptóticos, HSP27 é considerada como um importante regulador de proliferação de células cancerígenas, por aumentar a probabilidade de reparo do DNA deste

tipo de células (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011). A expressão de HSP27 é elevada em vários tipos de tumores, como câncer de mama, melanoma, adenocarcinoma gástrico e tumores cerebrais astrocíticos. Ademais, sua superexpressão confere as células tumorais um aumento na resistência contra fármacos utilizados para tratamento de neoplasias (CIOCCA; CALDERWOOD, 2005).

2. Justificativa

Como visto, o processo de envelhecimento populacional vem ocorrendo de forma acelerada, principalmente nos países em desenvolvimento. Contudo, apesar do aumento da expectativa de vida da população, o processo de envelhecimento populacional acompanha, conseqüentemente, uma maior incidência de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington, doenças cardiovasculares, metabólicas e neoplásicas. O tratamento para os portadores destas doenças visa oferecer uma melhora em sua capacidade funcional e qualidade de vida. Entretanto, ainda não existem estratégias farmacológicas capazes de promover a estabilidade, sendo necessários, portanto, mais estudos na área. A etiologia da maioria destas doenças ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que, no âmbito molecular e celular, estas doenças são causadas, na maioria das vezes, por proteínas que se agregam indevidamente, por estarem em sua conformação mal-enovelada.

Estudos têm sido desenvolvidos com organismos-modelo para identificar quais efeitos intracelulares afetam as funções das proteínas em um organismo diante do envelhecimento. Uma proteína humana envolvida na resposta celular a proteínas mal-enoveladas é HSP27. Entre as funções de HSP27 estão o aumento da degradação proteassomal de proteínas, contribuindo para homeostase proteolítica da célula. Até o momento, não existem estudos relacionados à superexpressão de HSP27 em leveduras que correlacionem esse efeito com longevidade. Devido a conservação de mecanismos biológicos, a relevância do presente estudo esta no fato deste tipo de pesquisa poder sugerir que a resposta à superexpressão de HSP27 em leveduras seja similar em células humanas.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da superexpressão de *HSP27* humana na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar o efeito da superexpressão de *HSP27*, sob controle de onze promotores mutantes TEF, na longevidade replicativa de *Saccharomyces cerevisiae*;
2. Analisar o efeito da superexpressão de *HSP27*, sob controle de onze promotores mutantes TEF, na longevidade cronológica de *Saccharomyces cerevisiae*;
3. Analisar o efeito da superexpressão de *HSP27*, sob controle de onze promotores mutantes TEF, na termotolerância de *Saccharomyces cerevisiae*;
4. Medir a atividade proteassomal em cada cepa contendo *HSP27* superexpressa sob controle de onze promotores TEF mutantes;
5. Medir a resistência a espécies reativas a oxigênio em cada cepa contendo *HSP27* superexpressa sob controle de um dos onze promotores TEF mutantes.

4.0 Material e métodos

4.1 Linhagens

A linhagem empregada neste trabalho foi a cepa RJD1144 (*MATa his3 Δ 200 leu2-3,112 lys2-801 trp1 Δ 63 ura3-52 PREI^{FH}::Ylplac211 (URA3)*) (VERMA et al., 2000).

4.2 Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos

Os meios de cultura listados abaixo foram autoclavados a 121°C, 1 ATM durante 15 minutos. Para o preparo do meio sólido, ágar bacteriológico foi adicionado na concentração final de 20g/L.

4.3 Meios e soluções

4.3.1 YPD

Reagente	Massa (g) ou volume (L)
Extrato de levedura	10g
Peptona	20g
Glicose	20g
Água MiliQ q.s.p.	1L

4.3.2 YPG

Reagente	Massa (g) ou volume (L)
Extrato de levedura	10g
Peptona	20g
Glicerol	0,030 L
Água MiliQ q.s.p.	1L

4.3.3 YNBD

Reagente	Massa (g) ou volume (L)
Base nitrogenada de levedura	1,7g
Sulfato de amônio	5g
Glicose	20g
Água MiliQ q.s.p.	1L

4.3.4 SDC

Reagente	Massa (g) ou volume (L)
Sulfato de amônio	5g
Base nitrogenada de levedura sem aminoácidos	1,8g
Glicose	20g
Fosfato monossódico	1,4g
Mistura de aminoácidos*	1,15g
Água MiliQ q.s.p.	1 L

*Mistura de Aminoácidos	Concentração final (mg/L)
Adenina	80
L-Arginina HCl	40
L-Ácido Aspartico	100
L-Ácido Glutâmico	100
Histidina*	80
L-Isoleucina	60
L-Leucina	30
L-Lisina*	60
L-Metionina*	80
L-Fenilalanina	60
L-Valina	150
L-Treonina	200
L-Serina	400
L-Tirosina	40
Uracila	20
L-Triptofano*	80

* Adicionou-se com excesso de 4 vezes os aminoácidos referentes as marcas auxotróficas (WEI; MADIA; LONGO, 2011).

No ensaio de longevidade cronológica (CLS) utilizou-se como marca auxotrófica o aminoácido triptofano e, portanto, produziu-se placas SD-trp para este propósito.

4.4 Construção de plasmídeos e manipulação genética

A sequência codificadora completa de *HSP27* humana contém 618 nucleotídeos e foi obtida da base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Para que o gene fosse expresso em levedura, utilizou-se a ferramenta de otimização de códons da Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>).

O gene *HSP27* foi amplificado por PCR a partir de dois gBlocks[®] sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Anexo 1). Os gBlocks[®] foram desenhados no software OVERFRAG desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Antonio Digiampietri, da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH-USP). O primeiro gBlock[®] possui 412 pb e contém uma porção (-52 a -1) da região promotora do gene *TEF2*, que codifica o fator de alongação de tradução 1 α de *S. cerevisiae*, adjacente à região codificadora otimizada de *HSP27* (+1 a 369). O segundo gBlock[®] (249 pb) possui o gene *HSP27* otimizado (+319 a 618) adjacente aos primeiros 122 pb da região terminadora do gene *CYC1*. Ambos os gBlocks[®] possuem 50 pb que permitem sua sobreposição para a amplificação por PCR.

As condições de reação foram de acordo com as recomendações do fabricante da enzima *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Utilizou-se um termociclador LongGene programado para realizar a PCR em duas etapas. A primeira consistiu em 10 ciclos com temperatura de anelamento a 55°C sem os oligos, e a segunda etapa a 55°C com 30 ciclos na presença dos oligos. A temperatura final de extensão foi 68°C, quando os oligos, por 5 minutos, terminam as amplificações incompletas. Para finalizar, deixaram-se as amostras a 4°C por tempo indeterminado (Tabela 3). Os oligonucleotídeos utilizados encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 3. Condições da reação de amplificação de *HSP27* por PCR

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturação Inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Denaturação	94°C	30 s	10 ciclos
Pareamento	55°C	30 s	
Extensão	68°C	40 s	
Denaturação	94°C	30 s	30 ciclos
Pareamento	55°C	30 s	
Extensão	68°C	5 min	
Término	4°C	Indefinido	1 ciclo

Tabela 4. Oligos utilizados para amplificação do gene *HSP27*.

Região	Oligos	Sequência (5'→3')	Cp.	Tm	Produto
Amplificada			(pb)	(°C)	(pb)
TEF-HSP27-C'	HSP27opt-PstI-F	GAC TGA CTG CAG ATG ACT	32	61,3	642
		GAA AGA AGA GTT CC			
		TCA GTC AAG CTT CTA TTT			
	HSP27opt-HindIII-R	TGC TGC TGT TTC GTC	33	61,9	

Cp. = comprimento. Tm = temperatura de melting

O produto de PCR, com 642 pb, contendo a região codificadora de *HSP27* flanqueada pelo promotor TEF na região 5' e o terminador do gene *CYC1* na porção 3', foi digerido pelas enzimas de restrição *PstI* e *HindIII* e clonado no vetor p415TEF (MUMBERG; MAILER; FUNK, 1995), produzindo o plasmídeo p415TEF-HSP27. Este plasmídeo foi digerido com *SacI* e *KpnI*, e o cassete de expressão TEF(P)-HSP27-CYC1(TT) foi clonado no vetor integrativo Ylplac128 (GIETZ; AKIO, 1988), obtendo-se o plasmídeo Ylplac128-TEFnat-HSP27.

Para modular a expressão de *HSP27* em diferentes intensidades, o promotor TEF2 selvagem foi substituído por fragmentos de DNA de uma biblioteca de promotores TEF

mutantes (ALPER et al., 2005), utilizando-se as enzimas de restrição *SacI* e *SpeI*. Essa biblioteca de promotores permitiu expressar *HSP27* em 9 níveis gradualmente ordenados.

Toda manipulação de moléculas de DNA recombinante foi realizada conforme manual disponível na literatura (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As digestões com enzimas de restrição foram conforme as recomendações do fabricante. A purificação de DNA separado em gel de agarose foi realizada com o kit Qiaquick (Qiagen). A transformação bacteriana foi realizada na presença de cloreto de cálcio, conforme procedimento já descrito (HANAHAHAN, 1983); a de levedura, na presença de acetato de lítio (GIETZ; WOODS, 2002).

4.4 Análise da expressão protéica por Western Blot

Para a extração de proteínas, pré-inóculos de 5 mL em YPD foram incubados a 30°C em agitação contínua, a 300 r.p.m., *overnight*. Diluíram-se as culturas em 10 mL de YPD a fim de obter $O.D._{600} = 0,1$, e deixou-se crescer nas mesmas condições, *overnight*. No dia seguinte, coletou-se uma quantidade de cultura equivalente a $O.D._{600} = 3$ por centrifugação a 13.000 r.p.m. por 30 s, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água miliQ e 160 µL de solução de lise (1.85 M NaOH, 7,4% β-mercaptoetanol) e incubou-se durante 10 minutos no gelo. Adicionou-se 160 µL de 50% TCA e incubou-se por mais 10 minutos no gelo. Centrifugou-se a 13.000 r.p.m. por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 60 µL da solução 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) contendo 5% β-mercaptoetanol. Ferveu-se o extrato proteico durante 4 minutos a 94°C e armazenou-se as amostras em freezer -80°C por no máximo 7 dias. Para separação de proteínas foi utilizado SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 12%, onde 15 µL de proteínas extraídas foram aplicadas em cada poço do gel. Efetuou-se a eletroforese na presença de tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25 mM e 0,1% SDS) a 150V durante os primeiros 15 minutos, aumentando-se para 200V até as bandas de azul de bromofenol alcançarem o final do gel.

Após a eletroforese, realizou-se a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de PVDF coberta com tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris 25 mM e 20% metanol) no equipamento de transferência Owl™ HEP Series Semidry

Electroblotting Systems (Thermo Fisher Scientific) submetida a 200 mA durante 1 hora. Após a transferência, corou-se a membrana de PVDF com Ponceau S para a visualização das bandas proteicas. A coloração foi removida com três lavagens de 10 minutos cada com o tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM e 1% Triton). Incubaram-se as membranas de PVDF contendo as proteínas transferidas durante 1 hora em solução de lavagem com a adição de 5% leite em pó desnatado, para bloqueamento de ligações inespecíficas. Em seguida, incubaram-se as membranas de PVDF com anticorpo primário durante 16h, a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, lavou-se a membrana de PVDF três vezes por 8 minutos com o tampão de lavagem, e, na sequência, incubou-se com anticorpo secundário (em solução de lavagem contendo 5% leite em pó desnatado) durante 1 h, à temperatura ambiente. Para a revelação, lavou-se a membrana de PVDF três vezes por oito minutos em tampão de lavagem e aplicou-se a solução de quimioluminescência Clarity Western ECL Substrate (Bio-rad) por 5 minutos. Após a incubação, escaneou-se a membrana de PVDF no aparelho C-Digit Blot Scanner (Lycor) para visualização do resultado final.

Utilizou-se o anticorpo primário anti-HSP27 (Santa Cruz Biotechnology) sob diluição de 1:1000 e como controle anticorpo primário anti-Pgk1p (Sigma-Aldrich) sob diluição 1:3000. O anticorpo secundário utilizado foi o goat anti-mouse conjugado com peroxidase (Bio-rad) sob diluição de 1:3000.

4.5.1 Análise de imagem e normalização de dados

A imagem escaneada foi analisada no *software* ImageJ e a porcentagem de expressão da HSP27 foi calculada segundo a normalização pela soma das replicatas (n=3) (DEGASPERI et al., 2014). Esta normalização é feita da seguinte forma: 1) dividiu-se o valor de área de Pgk1 pelo da HSP27 de cada amostra, feito isso 2) somou-se todos os valores desta normalização (HSP27/Pgk1) e, por fim, 3) dividiu-se o valor de área inicial de HSP27 pelo valor total de HSP27/Pgk1. As barras de erro foram calculadas segundo desvio-padrão das três replicatas do experimento.

4.6 Ensaio de longevidade cronológica

Realizou-se o ensaio de longevidade cronológica segundo método previamente descrito (WEI; MADIA; LONGO, 2011). Uma colônia isolada da cepa de interesse foi crescida em 1 mL de meio líquido SDC, o qual foi incubado a 30°C, sob agitação a 300 r.p.m., por 16h. As células foram diluídas em água a 10^{-4} e adicionou-se alíquotas de 30µL em cada uma das dez placas SD-Trp (meio mínimo sem triptofano) e, a cada dois dias, retirou-se uma placa e pipetou-se sobre o ágar 500µL de triptofano (concentração final 2 mg/mL) para monitorar a viabilidade, após crescimento em estufa a 30°C (Figura 5). O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) do dia 0 foi considerado 100% de sobrevivência, usado para determinar a porcentagem de sobrevivência dependente da idade cronológica. Os dados dos ensaios de longevidade foram representados como média $\pm$ desvio padrão (triplicata).

Figura 5. Esquema para ensaio de longevidade cronológica. A) A partir do inóculo feito com uma colônia isolada, as células foram diluídas em água até 10^{-4} . Alíquotas de 30µL da diluição final foram semeadas em cada uma das 11 placas SD-Trp nomeadas de dia 0 até dia 20. B) No mesmo dia em que foi realizada a semeadura em placa, adicionou-se 500µL de triptofano à placa correspondente ao dia 0, e incubaram-se todas as 11 placas a 30°C. C) Após dois dias de incubação, contaram-se quantas UFC estavam presentes na placa do dia 0, adicionou-se a mesma quantidade de triptofano na placa do dia 2, e assim sucedeu-se o experimento até a contagem de UFC da placa do dia 20.

4.7 Ensaio de longevidade replicativa

A longevidade replicativa das células foi determinada conforme procedimento já estabelecido (PARK; MCVEY; GUARENTE, 2002). A partir do estoque à -80°C , riscou-se as células em uma placa YPD, deixou-se crescer a 30°C e, após 2 dias, riscou-se em uma placa YGP, incubando-se a 30°C por 2 dias. Repetiu-se o procedimento em YPG, a fim de remover quaisquer células petite (células com deficiência na função mitocondrial) da população. Selecionou-se colônias aparentemente funcionais e riscou-se em uma nova placa YPD, para dar início à dissecação das células. Usando uma agulha de vidro fixada a um micromanipulador, alinhou-se 50 células em placa YPD, com espaçamento de $50\ \mu\text{m}$ entre elas. O ágar foi perfurado com a agulha entre cada 10 células-mães para produzir pontos de referência na placa. Isolou-se a célula filha da segunda divisão, denominada célula-mãe fundadora virgem (Figura 6). As células-mães virgens foram incubadas a 30°C , para ocorrer a divisão celular. As células-filhas foram separadas da célula-mãe fundadora utilizando-se o micromanipulador. Após cada micromanipulação, registrou-se o número de vezes que cada célula-mãe gerou uma nova célula-filha. A placa foi incubada 4°C durante a noite. Quando as células-mães não produziram mais células-filhas, o experimento chegou ao seu fim. A significância estatística dos ensaios foi analisada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Figura 6. Esquema de uma placa para ensaio de longevidade replicativa. A partir de uma placa YPD com células crescidas, coletou-se uma pequena quantidade de massa de células com um palito de dente, e riscamo-las na placa (oval esquerdo). Alinhou-se 50 células-mães (círculos maiores) e após cada brotamento, as células-filhas (círculos menores) são separadas das mães e movidas para a região direita da placa para posterior contagem. As placas do ensaio são incubadas a 30°C . Adaptado de Park, McVey, & Guarente, 2002.

4.8 Ensaio de termotolerância

Células foram inoculadas em 10 mL de YPD e incubadas a 30°C sob agitação contínua, a 300 r.p.m., por 16h. Após o período de incubação, transferiu-se 1 mL da cultura principal para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e incubou-se a 56°C durante 30 minutos, a 300 r.p.m., em um termomixer (Eppendorf Thermomixer R Mixer). Em seguida, realizaram-se diluições seriadas destas suspensões de células e, subsequentemente, alíquotas de 10 µL da diluição final foram semeadas em meio sólido YPD. As placas foram incubadas a 30°C por 2 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e a significância estatística foi analisada segundo o teste t não-pareado, comparando os resultados obtidos com a amostra do vetor em relação a cada nível de superexpressão de HSP27 (SEMCHYSHYN; VALISHKEVYCH, 2016).

4.9 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Cresceram-se células em 10 mL de YPD a 30°C, sob agitação contínua (300 r.p.m.), por 16h. Após o período de incubação, transferiu-se 500µL da cultura principal para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas concentrações 0,5, 0,75 e 1 mM, incubando-as a 30°C durante 30 minutos, a 300 r.p.m. em um termomixer (Eppendorf Thermomixer R Mixer). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em água miliQ estéril. Realizaram-se diluições seriadas destas suspensões de células e, subsequentemente, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em meio sólido YPD. As placas foram incubadas a 30°C por 2 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata e a significância estatística foram analisados segundo o teste t não-pareado, comparando os resultados obtidos com a amostra do vetor em relação a cada nível de superexpressão de HSP27 (SEMCHYSHYN; VALISHKEVYCH, 2016).

4.10 Determinação da atividade peptidásica do proteassomo 20S

Foram feitos pré-inóculos em YPD das células selvagens e transformantes, que foram incubados a 30°C em agitação contínua a 300 r.p.m. overnight. Diluiu-se as culturas em 100 ml a fim de obter $O.D._{600} = 0,1$, e deixou-se crescer nas mesmas condições durante 7 e 14 dias para obter células na fase estacionária. Para cada período determinado, alíquotas de 50 ml foram coletadas, centrifugadas a $1200 \times g$ durante 3 min a 25°C e lavadas em água deionizada sob as mesmas condições. Para determinar a atividade peptidásica do proteassomo 20S da linhagem selvagem e transformantes obtidos a partir do extrato celular, adicionou-se aos tubos com pellets de células microesferas de vidro e tampão Tris 50 mM $MgCl_2$ 5 mM pH 7,5. Procedeu-se ao rompimento das células por agitação, utilizando um vórtex a 1800 r.p.m. em agitação constante, na câmara fria por 60 min. O lisado foi centrifugado por 10 min a $10000 \times g$, 4°C, e após este procedimento descartou-se o pellet e coletou-se o sobrenadante contendo extrato celular para a realização do experimento. Utilizou-se o peptídeo fluorogênico Suc-LLVY-AMC como substrato para a avaliação da atividade do tipo quimiotripsina (ChT-L). Alíquotas contendo 50 µg de extrato celular foram incubadas com 50 µM de substrato peptídico em tampão 50 mM Tris-HCl 5 mM $MgCl_2$ pH 7,5 a 30°C. O aumento da emissão da fluorescência devido à clivagem do AMC pelo proteassomo foi monitorado durante 30 minutos a 440 nm (excitação a 365 nm) em um espectrofluorímetro de placa (Flex Station 3, Molecular Devices). Os ensaios foram realizados em duplicata e a significância estatística foi analisada segundo o teste t não-pareado, comparando os resultados obtidos com a amostra do vetor em relação a cada nível de superexpressão de HSP27(MARQUES; DEMASI; KOWALTOWSKI, 2011).

5. Resultados

5.1 Clonagem dos promotores mutantes TEF no vetor YIplac128-TEFnat-HSP27

Para modular a expressão de *HSP27* em diferentes intensidades, resolveu-se clonar a biblioteca de promotores TEF mutantes (ALPER et al., 2005) no vetor integrativo YIplac128 contendo *HSP27* humana com expressão controlada pelo promotor TEF nativo (TEFnat) (Figura 7).

Figura 7. Construção da biblioteca YIplac128-TEF-HSP27. A) Os vetores da biblioteca p416TEF (ALPER et al., 2005) foram digeridos com *SacI/XbaI* para remoção dos promotores mutantes TEF que foram posteriormente ligados no vetor integrativo YIplac128-TEFnat-HSP27, digerido com *SacI* e *SpeI*. B) Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos p416TEF contendo os 11 promotores TEF mutantes. C) Eletroforese em gel de agarose da digestão do vetor integrativo YIplac128-TEFnat-HSP27. As setas indicam os fragmentos que foram isolados e purificados e “P” refere-se ao padrão de peso molecular utilizado (Gene Ruler 1kb plus DNA Ladder-Thermo Fischer Scientific).

Todos os promotores TEF foram liberados dos plasmídeos p416TEF utilizando-se *SacI* e *XbaI*, com a exceção dos promotores TEF 1 e 8 (Figura 7B) que não liberaram o fragmento. Para ligar os fragmentos TEF no vetor integrativo YIplac128-TEF-nat-HSP27, realizou-se uma digestão deste vetor com *SacI* e *SpeI*, a fim de remover o promotor TEF nativo (Figura 7C). Ao ligar as extremidades *XbaI* com *SpeI*, que possuem terminais compatíveis, perdem-se ambos os sítios. A confirmação da ligação do fragmento do vetor integrativo YIplac128-TEFnat-HSP27 e com os fragmentos TEF encontram-se na figura 7. Utilizamos como controle o vetor integrativo YIplac128 contendo o TEF nativo e HSP27 humana, pois este possui o sítio de restrição *XbaI* a montante do promotor de TEF. Uma vez que retira-se o TEF nativo e insere-se a biblioteca de TEF mutantes no plasmídeo YIplac128, perde-se o sítio de restrição *XbaI*, restando apenas de *SpeI* (Figura 8A). Desta forma, os fragmentos liberados pelas digestões com as enzimas *XbaI* e *SacI* são diferentes para cada um dos plasmídeos.

Figura 8. Confirmação da ligação dos promotores TEF no fragmento do vetor integrativo YIplac128 contendo HSP27 humana. A) Mapa do plasmídeo YIplac128-TEF-HSP27 contendo seus respectivos sítios de restrição. Ao ligar as extremidades *XbaI* com *SpeI*, que possuem terminais compatíveis, perdem-se ambos os sítios, e isso é representado com (*XbaI/SpeI*). B) Os plasmídeos YIplac128-TEF-HSP27 foram digeridos com *SacI* e *XbaI*, liberando fragmentos de 1209 pb e 805 pb. (C) Por possuir um padrão de digestão distinto do plasmídeo contendo os promotores TEF mutantes, utilizamos como controle o vetor integrativo YIplac128 contendo o TEF nativo e HSP27 humana. Este

plasmídeo foi digerido com *SacI* e *XbaI*, liberando fragmentos de 600 pb e 401 pb. A seta indica o fragmento que foi liberado e “P” refere-se ao padrão de peso molecular utilizado (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fischer Scientific).

Com a exceção dos promotores TEF 1 e 8, todos os promotores da biblioteca de mutantes TEF foram clonados e dirigem a expressão de *HSP27*.

5.2 Quantificação protéica de HSP27

Alper et al (2005) verificaram o nível de expressão gênica de cada um dos 11 promotores TEF mutantes e estabeleceram uma ordem crescente de expressão a partir do TEF 1 até o TEF 11, que corresponde à ordem numérica. Para confirmar essas observações, analisou-se o nível de expressão protéica de HSP27 nas linhagens utilizadas. Para isso, realizou-se uma separação de proteínas dos extratos protéicos das linhagens que superexpressam HSP27 por SDS-PAGE em gel 12%. Posteriormente, as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana PVDF e expostas ao corante Ponceau S para confirmação da transferência (Figura 9).

Figura 9. Coloração protéica com Ponceau S em *S. cerevisiae*. Após a corrida do extrato proteico das linhagens que superexpressam HSP27 sob controle de nove promotores mutantes TEF e das células que não expressam HSP27 (Vetor) em gel 12% SDS-PAGE, realizou-se a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF a 200 mA durante 1 hora. Para visualizar se as proteínas foram transferidas, a membrana de PVDF foi corada com Ponceau S. O padrão de peso molecular utilizado foi SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard (ThermoFisher scientific).

Observa-se que a transferência das proteínas para a membrana de PVDF foi satisfatória, uma vez que há bandas coradas com Ponceau em todas as canaletas das amostras. Em seguida, incubou-se a membrana com anti-HSP27 e posteriormente com anticorpo secundário goat anti-mouse conjugado com peroxidase a fim de quantificar a expressão protéica de HSP27 (Figura 10) e verificar se aumentaria conforme os resultados obtidos por Alper et al (2005) –quanto maior o valor numérico atribuído ao TEF, maior seria a quantidade de proteína sintetizada.

Figura 10. Análise da expressão de HSP27 humana em *S. cerevisiae*. Western blot foi utilizado para mensurar os níveis de expressão protéica de HSP27 sob controle de nove promotores mutantes TEF e em células que não expressam HSP27 (Vetor). Utilizou-se o anticorpo anti-Pgk1 de levedura como controle. As proteínas HSP27 e Pgk1 possuem 27 e 44 kDa, respectivamente.

De acordo com a figura acima, a ordem crescente de intensidade de expressão, que corresponde à ordem numérica dos promotores TEF (ALPER et al., 2005) não foi observada, uma vez que a quantidade de HSP27 expressa entre as amostras variou de forma não-linear. Por exemplo, esperava-se que o maior nível de expressão fosse ocasionado pelo promotor TEF 11, devido ao fato de que é o promotor TEF mutante de maior valor numérico. Contudo, o resultado obtido por Western blot demonstrou que entre nossas amostras, o promotor TEF 5 foi o responsável por expressar HSP27 de forma mais proeminente.

Devido às incongruências expostas e para evitar possível confusão nos eixos horizontais das figuras, decidiu-se renomear os promotores TEF mutantes a fim de se obter uma sequência numérica crescente que reflete a concentração de HSP27 presente nas linhagens empregadas neste trabalho (Tabela 5).

Tabela 5. Renomeação dos promotores TEF mutantes por nível de expressão proteica.

Nome original	Renomeação	% do nível de expressão de HSP27
TEF 2	TEF 1'	0,98%
TEF 11	TEF 2'	2,40%
TEF 3	TEF 3'	3,99%
TEF 7	TEF4'	4,20%
TEF 4	TEF 5'	7,65%
TEF nativo	TEF nativo	8,00%
TEF 9	TEF 6'	10,58%
TEF 6	TEF 7'	13,54%
TEF 10	TEF 8'	13,56%
TEF 5	TEF 9'	17,89%

Os promotores TEF mutantes e TEF nativo foram dispostos e realinhados segundo o nível de expressão de HSP27 verificado em cada linhagem de *S. cerevisiae*.

A partir disso, novas análises de Western blot foram realizadas conforme o reordenamento das amostras, e os resultados encontram-se na figura 11.

Figura 11. Análise da expressão de HSP27 humana em *S. cerevisiae*. Western blot foi utilizado para mensurar os níveis de expressão protéica de HSP27 sob controle de nove promotores mutantes TEF e em células que não expressam HSP27 (Vector). Utilizou-se Pgk1 de levedura como controle para a normalização da expressão. As proteínas HSP27 e Pgk1 possuem 27 e 44 kDa, respectivamente.

5.3 Análise da Longevidade replicativa e cronológica em células superexpressando *HSP27* sob controle do promotor TEF nativo

Dentre às inúmeras funções das HSP, está a capacidade de proteger as células de múltiplos fenótipos observados no envelhecimento, como proteotoxicidade, apoptose e agregação protéica. Contudo, ao longo do envelhecimento as células sofrem declínios em algumas vias de transcrição, incluindo a de *HSF1*, levando a uma menor síntese de HSPs (ANCKAR; SISTONEN, 2011). Em seres humanos, a superexpressão de *HSP27* é capaz de aumentar a sobrevivência celular em vários tecidos, como rins (LI et al., 2017), fígado. (PARK et al., 2009) e particularmente do coração, atenuando disfunções cardíacas relacionadas ao processo de envelhecimento (LIN et al., 2016; LU et al., 2008). Em organismos-modelo, mostraram que há aumento significativo da longevidade quando superexpressa-se *HSP27* de *D. melanogaster* (WANG; KAZEMI-ESFARJANI; BENZER, 2004). Em vista disso, objetivou-se analisar o efeito da superexpressão de *HSP27* humana sob controle do promotor TEF nativo, utilizando *S. cerevisiae* como organismo-modelo eucarioto.

Realizou-se os ensaios de longevidade replicativa e cronológica de células WT e das que superexpressam *HSP27* sob controle do promotor TEF nativo. Os resultados de ambos os experimentos encontram-se na figura 12.

Figura 12. Efeito da superexpressão de *HSP27* sob controle do promotor TEF nativo na longevidade replicativa e cronológica em comparação a células selvagens (WT). A) Ensaio de longevidade replicativa. Dissecou-se 50 células de *S. cerevisiae* WT e TEF nativo-HSP27 em micromanipulador em meio YPD. As gerações correspondem ao número de brotos produzidos pelas células-mães da população ao longo do experimento. As curvas representam o melhor de dois experimentos com resultados similares. B) Ensaio de longevidade cronológica. A cada dois dias, triptofano foi adicionado às placas. O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *S. cerevisiae* WT e das colônias com a construção TEF nativo-HSP27 foram contadas a cada dois dias em meio SDC. As curvas representam a média final de cada experimento realizado em triplicata e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Observou-se que as células com superexpressão de *HSP27* não tiveram um aumento significativo na longevidade cronológica em relação às células selvagens (Figura 12B). Contudo, na longevidade replicativa percebeu-se um aumento moderado na expectativa de vida das células ($p < 0,05$) (Figura 12A). A partir disso, investigamos se este aumento foi efeito exclusivo da chaperona *HSP27*, ou se algum outro fator no plasmídeo integrativo YIplac128-TEF_{nat}-*HSP27*, de alguma forma, garantiu tal extensão. Para isso, produziu-se um plasmídeo contendo apenas o promotor TEF nativo (vetor) sem a presença de *HSP27*, e comparou-se os dados com as células WT (Figura 13).

Figura 13. Análise da longevidade replicativa e cronológica das células selvagens (WT) em comparação ao vetor. A) Ensaio de longevidade replicativa. Dissecou-se 50 células de *S. cerevisiae* WT e vetor em micromanipulador em meio YPD. As gerações correspondem ao número de brotos produzidos pelas células-mães da população ao longo do experimento. As curvas representam o melhor de dois experimentos com resultados similares. A significância estatística está indicada na tabela 6 (Anexo 2). B) Ensaio de longevidade cronológica. A cada dois dias, triptofano era adicionado às placas. O número de UFCs das amostras WT e vetor foram contadas a cada dois dias em meio SDC. As curvas representam a média final de cada experimento realizado em triplicata e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Como esperado, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as amostras nas longevidades analisadas, concluindo-se que o efeito de extensão da longevidade replicativa deveu-se pela superexpressão de *HSP27* e não por outros fatores presentes no plasmídeo.

5.4 Análise da Longevidade replicativa em células superexpressando *HSP27* sob controle de nove promotores TEF mutantes

Uma vez constatado que a superexpressão de *HSP27* estende a longevidade replicativa, questionou-se quais seriam os possíveis efeitos em um experimento utilizando diferentes níveis de expressão de *HSP27*. Em vista disso, analisou-se o efeito da superexpressão de *HSP27* humana sob controle de nove promotores TEF mutantes, sendo que o promotor TEF nativo representa um nível de expressão entre o TEF5 e TEF6 (ALPER et al., 2005). Os resultados encontram-se na figura 14.

Figura 14. Efeito da superexpressão de *HSP27* sob controle de 9 promotores mutantes TEF na longevidade replicativa em comparação ao vetor. A-I) Dissecou-se 50 células de *S. cerevisiae* WT e *HSP27* em micromanipulador em meio YPD. As gerações correspondem ao número de brotos produzidos pelas células-mães da população ao longo do experimento. As curvas representam o melhor de dois experimentos com resultados similares. A significância estatística está indicada na tabela 6 (Anexo 2). * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$.

À medida que se varia o nível de expressão de *HSP27*, obtêm-se respostas celulares distintas para cada experimento, culminando em um aumento dramático da longevidade para as células que tiveram a expressão de *HSP27* sob controle do promotor TEF8' ($p < 0,0001$). A longevidade média da linhagem de *S. cerevisiae* contendo o vetor vazio foi de 22 gerações, enquanto a da linhagem que contém *HSP27* sob controle do promotor TEF8' foi de 31 gerações. O mesmo pode ser observado em relação à longevidade máxima, em que a linhagem contendo o vetor foi de 44 gerações e da cepa que carrega o que codificante de *HSP27* sob controle do promotor TEF8' foi de 79 gerações ($p < 0,0001$), tendo um aumento de 79% na sua longevidade máxima (Figura 14H).

5.5 Análise da Longevidade cronológica em células superexpressando *HSP27* sob controle dos promotores TEF mutantes

A fim de analisar se o efeito da superexpressão de *HSP27* provoca um aumento ou redução na longevidade média e máxima, realizou-se o ensaio de longevidade cronológica por ensaio de viabilidade em placa. Os resultados encontram-se na figura 15.

Figura 15. Efeito da superexpressão de *HSP27* sob controle de 9 promotores mutantes TEF na longevidade cronológica em comparação ao vetor. A-I) Células em G₀ foram semeadas em placas SD-trp. A cada dois dias, triptofano era adicionado às placas. O UFCs de *S. cerevisiae* vetor e *TEF-HSP27* foram contadas a cada dois dias em meio SDC. As curvas representam a média final de cada experimento realizado em triplicata e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Diferentemente do ensaio de longevidade replicativa, observou-se que as células com superexpressão de *HSP27* não obtiveram um aumento na longevidade cronológica em comparação as células selvagens. Observa-se apenas uma redução na longevidade nas células que superexpressam *HSP27* sob controle do promotor TEF 2' (Figura 15B).

5.6 Ensaio de atividade proteassomal em células superexpressando *HSP27* sob controle dos promotores TEF mutantes

A degradação de proteínas comumente é efetuada pelo sistema ubiquitina-proteassomo, e experimentos de co-imunoprecipitação verificaram que *HSP27* estava ligada ao proteassomo, indicando a possibilidade de interação direta entre ambos. A superexpressão de *HSP27*, desencadeada por estímulos estressores, leva ao aumento da função proteassomal, (PARCELLIER et al., 2003). Outros pesquisadores mostraram que a atividade proteassomal induzida por sulforafano, deveu-se pelo aumento da expressão de *HSP27* (GAN et al., 2010). Por estes motivos, realizamos o ensaio de atividade proteassomal (Figura 16) com intuito de observar o tipo de resposta em diferentes níveis de expressão de *HSP27* e investigar se a extensão da RLS é devido ao aumento da atividade proteassomal.

Figura 16. Atividade proteassomal em células que superexpressam *HSP27* sob controle de 9 promotores mutantes TEF em comparação ao vetor. A-B) Foram incubados 50 µg do extrato celular com 50 µM de substrato peptídico suc-LLVY-AMC na presença de tampão de atividade Tris 50 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM a 30°C. A emissão da fluorescência foi registrada durante 30 minutos no comprimento de onda 440 nm (excitação a 365 nm). Os resultados mostrados referem-se à média de dois experimentos realizados em duplicata. u. arb.: unidades arbitrárias. A significância estatística está indicada na tabela 7 (Anexo 2). * p<0,05 **p<0,005.

Para cada tempo de incubação, observou-se uma atividade proteassomal distinta, ressaltando-se que em 14 dias de incubação é possível notar uma melhora significativa na

atividade do proteassomo mediante o nível de superexpressão de *HSP27* humana sob controle do promotor TEF nativo ($p<0,05$), TEF6' ($p<0,05$), TEF8' ($p<0,005$) e TEF2' ($p<0,05$) quando comparados ao vetor (Figura 16B). O ensaio realizado com sete dias de incubação apresentou melhora na atividade proteassomal somente em relação ao nível de superexpressão do promotor TEF nativo ($p<0,05$), indicando que a maioria das células do vetor e transformantes obtiveram um desempenho semelhante (Figura 16A).

5.7 Ensaio de estresse oxidativo e choque térmico em células superexpressando *HSP27* sob controle dos promotores TEF mutantes

Frente a condições estressoras (aumento de temperatura, estresse oxidativo), as células empregam uma grande rede de proteostase para manter a funcionalidade de seu proteoma. As sHSP fazem parte desta rede, e sua função mediante a condição de estresse é sequestrar proteínas mal enoveladas e impedi-las de se agregarem irreversivelmente (HASLBECK; VIERLING, 2015). Em células de mamíferos, constatou-se que *HSP27* 1) diminui os níveis de espécies reativas a oxigênio em decorrência da modulação do sistema glutathiona (ARRIGO et al., 2005), 2) previne a agregação de proteínas desnaturadas por duas vias – auxiliando a proteína a retornar ao seu estado conformacional nativo ou pela sua degradação via SUP (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011), e 3) protege os microfilamentos de actina presentes no citoesqueleto contra danos térmicos (LOKTIONOVA; KABAKOV, 1998) e oxidativos (ROGALLA et al., 1999).

Considerando estas funções de *HSP27*, verificou-se o tipo de resposta em diferentes níveis de expressão de *HSP27* frente a estes estímulos estressores, uma vez que estes atributos podem ter influenciado no aumento da RLS.

O resultado do ensaio de desafio com peróxido de hidrogênio encontra-se na figura 17.

Figura 17. Ensaio de desafio com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células que superexpressam *HSP27* sob controle de 9 promotores mutantes TEF em comparação ao vetor. A-C) As células foram incubadas com diferentes concentrações de H₂O₂ por 30 minutos, diluídas e plaquedadas em YPD. O número de UFCs de *S. cerevisiae* TEF-*HSP27* e vetor foram contadas após dois dias de incubação a 30°C. Os resultados mostrados referem-se à média de experimentos realizados em triplicata. A significância estatística está indicada na tabela 8 (Anexo 2). *p<0,05 **p<0,005 ***p<0,0005.

À medida que aumenta a concentração de H₂O₂, a sobrevivência de todas as amostras diminuiu. Contudo, alguns transformantes de *HSP27* obtiveram uma melhor resposta frente a altas concentrações (1 mM), representada por TEF6', TEF7' e TEF8' ($P<0,005$). Estes resultados corroboram com o fato de que o TEF6' sobressaiu-se no ensaio proteossomal a 14 dias e junto ao TEF8', foram os mais longevos no ensaio RLS.

Os resultados do ensaio de termotolerância encontram-se na Figura 18.

Figura 18. Ensaio de choque térmico em células que superexpressam *HSP27* sob controle de 9 promotores mutantes TEF em comparação ao vetor. As células foram expostas à temperatura de 56°C por 30 minutos, diluídas e semeadas em YPD. O número de UFCs de *S. cerevisiae* TEF-*HSP27* e do vetor foram contadas após dois dias de incubação a 30°C. Os resultados mostrados referem-se à média de experimentos realizados em triplicata. A significância estatística está indicada na tabela 9 (Anexo 2). * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$.

Assim como os demais experimentos, mediante a variação de expressão de *HSP27* obteve-se uma resposta distinta. Neste experimento, nota-se que a superexpressão de *HSP27* foi capaz de aumentar a tolerância ao choque térmico das células, com exceção do promotor TEF5' e TEF7'. Os promotores TEF1', TEF nativo e TEF8' foram os mais termotolerantes entre as amostras ($P < 0,0005$).

6. Discussão

A senescência celular leva a uma atenuação e alteração de diversas vias de sinalização, bem como a expressão de fatores de transcrição, como HSF1, responsável por se ligar a HSE (do inglês, “*heat shock element*”) e transcrever genes de *HSP*, os quais possuem relação direta com a longevidade e processo de envelhecimento de várias espécies. Segundo a literatura, quando se superexpressa certas HSP ou HSF1, há extensão da expectativa de vida dos organismos modelos estudados. (KUMSTA; HANSEN, 2017; MORLEY; MORIMOTO, 2004; MURSHID; EGUCHI; CALDERWOOD, 2013). Em relação à HSP27, a sua superexpressão aumentou a sobrevivência de *D. melanogaster* (WANG; KAZEMI-ESFARJANI; BENZER, 2004). Em análise de certas espécies de animais longevos identificou-se que HSP27 estava mais expressa comparada a animais não longevos, e o mesmo ocorreu em ratos longevos, nos quais verificou-se que *HSP25* – homólogo murino de *HSP27* – estava com níveis de expressão aumentados (PRIDE et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2016). Em levedura, este tipo de pesquisa nunca foi realizada anteriormente, e de acordo com os resultados obtidos, a superexpressão de *HSP27* sob controle de 9 promotores TEF mutantes diferentes também culminou no aumento de sobrevivência das células. Entretanto, este aumento somente foi observado na longevidade replicativa, não na cronológica. Portanto, supomos que as vias pelas quais HSP27 garante o aumento de sobrevivência é de forma específica, e independente das vias representadas pela longevidade cronológica. Frente a isso, houve a necessidade de se elucidar quais foram os possíveis fatores que levaram a este aumento de RLS. Segundo a literatura, HSP27 faz parte do grupo das sHSP, logo, possui a capacidade de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse térmico, atuando no enovelamento de polipeptídeos nascentes ou mal-enovelados (MEYER; SILVA, 1999). Em relação ao estresse oxidativo, HSP27 é capaz de aumentar os níveis de glutathiona (ARRIGO et al., 2005), cooperar com o sistema de degradação proteica (GAN et al., 2010; PARCELLIER et al., 2003, 2006), e descobriu-se que HSP27 reduz a toxicidade dos agregados de Huntingtina em ratos modelo para doença de Huntington, não colaborando somente para reduzir a formação de agregados, mas também na redução de estresse oxidativo gerados por estes (PARASKEVAKOU et al., 2007). Desta forma, realizamos experimentos de estresse térmico, oxidativo e atividade proteassomal. Em todos os experimentos, observamos que a superexpressão de *HSP27* melhorou o desempenho das células frente a esses estímulos

estressores, garantindo uma maior viabilidade na população de células, além de aumentar a atividade proteossomal.

Os dados apresentados corroboram com o que está descrito em estudos correlatos, no entanto, nem todos os níveis de expressão de *HSP27* corresponderam da mesma forma, demonstrando-se o contrário da hipótese inicial de que quanto mais *HSP27* fosse expressa, maior seria a longevidade das células assim como seu desempenho nos demais testes. Ressalta-se neste ponto que, em relação aos níveis de expressão proteica, os resultados obtidos por Western Blot mostraram que a superexpressão de *HSP27* mediada pelos nove promotores TEF divergiram da ordem numérica exposta por Alper et al (2005). O mesmo ocorreu em uma pesquisa conduzida por Nevoigt et al (2006), integrante do mesmo grupo de pesquisa que Alper. Neste estudo verificou-se que a força dos onze promotores TEF mutantes, que substituíram o promotor do gene *GPD1*, em análises dos níveis de atividade citosólica da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *S. cerevisiae*, também não foi linear (NEVOIGT et al., 2006). No presente estudo, algumas diferenças foram notórias, como o ocorrido com o TEF de maior valor numérico e, portanto, de maior força de expressão, representado pelo TEF11 (renomeado de TEF2'). Este promotor TEF mutante foi o que conferiu uma das menores expressões de *HSP27* entre as amostras – o contrário do esperado pelo TEF5, renomeado de TEF9', por ter se comportado como o promotor mais forte.

Nota-se que em cada experimento, a expressão de *HSP27* sob certos promotores TEF mutantes proporcionou melhor desempenho do que em outros. Por exemplo, a atividade proteossomal mensurada após 14 dias de incubação das células foi a que mais notamos esta diferença, no qual o promotor TEF8' se sobressaiu entre os demais. O mesmo pode-se notar em relação ao experimento de termotolerância, em que os promotores TEF,1' TEF8' e TEF nativo tiveram o maior desempenho. No ensaio de estresse oxidativo, na última concentração de peróxido de hidrogênio utilizada, pode-se observar com maior clareza a diferença entre os promotores, ressaltando os TEF6', TEF7' e TEF8'. Já os promotores TEF2', TEF3', TEF5' e TEF9' tiveram comportamento igual ou menor que o vetor em quase todos os experimentos.

Considerando todos estes ensaios realizados e comparando-os com a longevidade replicativa obtida por cada nível de expressão de *HSP27*, conclui-se que o promotor TEF8' provavelmente garantiu a expressão ótima de *HSP27* entre as amostras, por ter sido aquele com desempenho maior em quase todos os experimentos, e ter promovido a maior

longevidade. E apesar do TEF1' e TEF6' não apresentarem resultados tão satisfatórios quanto TEF8', também foram capazes de promover resultados significativamente melhores se comparado aos demais promotores. Os resultados fenotípicos e bioquímicos, obtidos para os diversos níveis de expressão de *HSP27*, sugerem um efeito hormético. Hormese é definido por qualquer processo que em um organismo exiba uma resposta bimodal, quando as células são expostas ao aumento crescente de uma substância ou condição. Hormese, no contexto de envelhecimento, está fortemente relacionada à restrição calórica e ao exercício físico moderado (CALABRESE et al., 2015). Nossos resultados atendem ao critério de hormese, uma vez que, mediante o nível de expressão de *HSP27*, obtêm-se respostas melhores ou piores em relação à amostra controle, representados por “picos horméticos” (Figura 19).

Figura 19. Diferentes níveis de expressão de *HSP27* produzem resposta hormética em ensaios fenotípicos e bioquímico. Mediante o nível de expressão de *HSP27*, obtêm-se respostas variadas para cada uma das condições determinadas. Nessas respostas, há um padrão que sugere hormese. Estresse oxidativo H_2O_2 1mM; estresse térmico 56°C; atividade proteassomal 14 dias de incubação e longevidade replicativa máxima. Destacam-se os promotores TEF1' e TEF8' por terem picos de atividade maiores entre as amostras.

Supomos que isso ocorra, provavelmente, por que: (1) expressar em certos níveis *HSP27* pode causar uma sobrecarga à célula, sendo por gastos energéticos excessivos e manutenção da quantidade extra de proteína e/ou (2) ter um mecanismo eficiente para combater condições estressoras (choque térmico, oxidativo), porém, em excesso, pode gerar

um desbalanço na homeostase celular. Esta última hipótese justifica-se pelo fato que condições estressantes podem levar a uma resposta pró-sobrevivência que aumenta a longevidade do organismo. Entretanto, o benefício desta resposta é reduzido drasticamente em função da quantidade do estímulo, levando a diminuição da longevidade (HEKIMI; VAN RAAMSDONK, 2009; RISTOW; SCHMEISSER, 2011). E, por último, (3) supomos que dependendo do nível de expressão de HSP27, ocorre uma variação em sua estrutura organizacional, modulando sua atividade como chaperona. Estudos recentes têm demonstrado que mediante a fosforilação de certos resíduos de HSP27, obtêm-se uma diferenciação em sua capacidade de formar oligômeros, em que quanto mais fosforilada, maior é a dissociação de oligômeros e formação de dímeros. Essa mudança de nível organizacional influencia diretamente em sua atividade como chaperona, onde dímeros de HSP27 tiveram uma atividade bem mais pronunciada (JOVCEVSKI et al., 2015).

7. Conclusão

- Todos os promotores TEF-HSP27 foram capazes de estender a longevidade replicativa, mas o mesmo não foi observado em relação à longevidade cronológica.
- Houve aumento da atividade proteossomal após 14 dias de incubação das células, e os promotores TEF2' e TEF6' foram os que conferiram os melhores resultados.
- Os promotores TEF-HSP27 promoveram um aumento significativo da resistência ao estresse oxidativo, ressaltando-se os promotores TEF6' e TEF8' nas concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogênio.
- Os promotores TEF1', TEF8' e TEF nativo conferiram um aumento na resistência ao choque térmico.
- Verificou-se que os efeitos benéficos ocasionados pela superexpressão de HSP27 em *S. cerevisiae* seguem uma resposta bimodal, uma vez que foi mais acentuado para os níveis de expressão sob controle do promotor TEF1' e TEF8'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-SOUZA, L. et al. Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12778–12786, 2010.

ALPER, H. et al. Tuning genetic control through promoter engineering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 36, p. 12678–12683, 2005.

ANCKAR, J.; SISTONEN, L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 80, p. 1089–115, 2011.

ARRIGO, A. et al. Hsp27 Consolidates Intracellular Redox Homeostasis by Upholding Glutathione in Its Reduced form and and by Decreasing Iron Intracellular Levels. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, p. 414–424, 2005.

ARRIGO, A.-P. et al. Identity of the 19S “prosome” particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). **Nature**, v. 331, p. 192–4, 1988.

ARRIGO, A.-P. et al. Hsp27: Novel Regulator of Intracellular Redox State. **Journal of Biological Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 303–307, 2002.

BARANOVA, E. V. et al. The taming of small heat-shock proteins: Crystallization of the alfa-crystallin domain from human Hsp27. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 12, p. 1277–1281, 2009.

BARRIENTOS, A. et al. Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 20, p. 3063–3081, 2006.

BECKER, T.; BÖTTINGER, L.; PFANNER, N. Mitochondrial protein import : from transport pathways to an integrated network. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 85–91, 2012.

BERNALES, S.; PAPA, F. R.; WALTER, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 22, p. 487–508, 2006.

BONNER, J. J.; BALLOU, C.; FACKENTHAL, D. L. Interactions between DNA-bound

trimers of the yeast heat shock factor. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 501–508, 1994.

BRAUER, M. J. et al. Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. May, p. 2503–2517, 2005.

BRUEY, J. M. et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 9, p. 645–652, 2000.

CALABRESE, E. J. et al. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? **Biogerontology**, 2015.

CALDERWOOD, S. K.; MURSHID, A.; PRINCE, T. The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging – A Mini-Review. **Gerontology**, v. 55, p. 550–558, 2009.

CARPER, S. W.; ROCHELEAU, T. A; STORM, F. K. cDNA sequence of a human heat shock protein HSP27. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 21, p. 6457, 1990.

CARRA, S. et al. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. **Cell Stress and Chaperones**, 2017.

CARRASCOSA, J. L.; LLORCA, O.; VALPUESTA, J. M. Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. **Micron**, v. 32, n. 1, p. 43–50, 2001.

CASHIKAR, A. G.; DUENNWALD, M.; LINDQUIST, S. L. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 23869 –23875, 2005.

CHONDROGIANNI, N. et al. Proteasome activation : An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, p. 1–19, 2014.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress and Chaperones**, v. 10, p. 86–103, 2005.

COMPTA, Y. et al. Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: Which is more important? **Brain**, v. 134, n. 5, p. 1493–1505, 2011.

CRAWFORD, L. J.; WALKER, B.; IRVINE, A. E. Proteasome inhibitors in cancer therapy.

J. Cell Commun. Signal, v. 5, p. 101–110, 2011.

DICK, T. P. et al. Contribution of Proteasomal beta-Subunits to the Cleavage of Peptide Substrates Analyzed with Yeast Mutants *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25637–25646, 1998.

DOYLE, S. M.; GENEST, O.; WICKNER, S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 10, p. 617–629, 2013.

ELLIS, J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v. 328, p. 378–379, 1987.

ESTRUCH, F.; CARLSON, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular cellular biology**, v. 13, p. 3872–3881, 1993.

FARFEL, J. M. Fatores relacionados à senescência e à senilidade cerebral em indivíduos muito idosos : um estudo de correlação clinicopatológica. **Patologia**, p. 2–141, 2008.

FAROUT, L. et al. Distribution of Proteasomes and of the Five Proteolytic Activities in Rat Tissues. **Arch Biochem Biophysis**, v. 374, n. 2, p. 207–212, 2000.

FERNANDEZ, M. A. et al. Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid β -peptides ($A\beta$) by γ -secretase to increase 42-to-40-residue $A\beta$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31043–31052, 2014.

GADHAVE, K. et al. The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. XX, n. X, p. 1–16, 2016.

GAN, N. et al. Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35528–35536, 2010.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 4241–4257., 2000.

GIETZ, D. R.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 87–96, 2002.

GIETZ, R. D.; AKIO, S. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro

mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, v. 74, n. 2, p. 527–534, dez. 1988.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. October, p. 546–567, 1996.

HAHN, J. S. et al. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, p. 5249–5256, 2004.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

HASLBECK, M. et al. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. **EMBO Journal**, v. 18, p. 6744–6751, 1999.

HASLBECK, M. et al. A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, p. 445–455, 2004a.

HASLBECK, M. et al. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 23, p. 638–649, 2004b.

HASLBECK, M.; VIERLING, E. A First Line of Stress Defense : Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. **Journal of Molecular Biology**, 2015.

HEKIMI, S.; VAN RAAMSDONK, J. M. Deletion of the Mitochondrial Superoxide Dismutase *sod-2* Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 2, 2009.

HICKEY, E. et al. Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 10, p. 4127–4145, 1986.

HINO, M. et al. Small Heat Shock Protein 27 (HSP27) Associates with Tubulin / Microtubules in HeLa Cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 169, p. 164–169, 2000.

HU, J. et al. Assessing chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Mol Biol**, v. 965, p. 463–472, 2013.

HUANG, X. et al. Reducing signs of aging and increasing lifespan by drug synergy. **Aging Cell**, v. 12, n. 4, p. 652–660, 2013.

IBGE. Censo demográfico. 2010.

IKWEGBUE, P. C. et al. Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases and Cancer. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, p. 1–18, 2018.

JÄÄTTELÄ, M.; WISSING, D. Emerging Role of Heat Shock Proteins in Biology and Medicine. **Annals of medicine**, v. 24, p. 249–58, 1992.

JAKOB, U. et al. Small heat shock proteins are molecular chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, n. 268, p. 1517–1520, 1993.

JOVCEVSKI, B. et al. Phosphomimics Destabilize Hsp27 Oligomeric Assemblies and Enhance Chaperone Activity. **Chemistry & Biology**, p. 186–195, 2015.

KATOS, K. et al. Copurification of Small Heat Shock Protein with aB Crystallin from Human Skeletal Muscle ”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7718–7725, 1992.

KLOETZEL, P. M. Antigen processing by the proteasome. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 3, p. 179–187, 2001.

KNECHT, E. et al. Intracellular protein degradation in mammalian cells : recent developments. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2427–2443, 2009.

KUMSTA, C.; HANSEN, M. Hormetic heat shock and HSF-1 overexpression improve C . elegans survival by inducing autophagy. **Autophagy**, v. 8627, n. March, 2017.

LEWIS, J. et al. Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 293, n. 5534, p. 1487–1491, 2001.

LI, C. et al. Cytoprotective Effect of Heat Shock Protein 27 Against Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Renal Epithelial HK-2 Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 2211–2220, 2017.

LIN, S. et al. HSP27 Alleviates Cardiac Aging in Mice via a Mechanism Involving Antioxidation and Mitophagy Activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

LOKTIONOVA, S. A.; KABAKOV, A. E. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation , F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. **FEBS**, v. 433, p. 294–300, 1998.

LONGO, V. D. et al. Replicative and chronological aging in *saccharomyces cerevisiae*. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 18–31, 2012.

LÖW, P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, n. 1, p. 39–43, 2011.

LU, X. et al. Overexpression of heat shock protein 27 protects against ischaemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction via stabilization of troponin I and T. **Cardiovascular Research**, v. 79, p. 500–508, 2008.

MACDONALD, M. E. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971–983, 1993.

MARIN-VINADER, L. et al. Hsp27 Enhances Recovery of Splicing as well as Rephosphorylation of SRp38 after Heat Shock. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 2, p. 886–894, 9 nov. 2006.

MARQUES, F.; DEMASI, M.; KOWALTOWSKI, A. J. Aging and calorie restriction modulate yeast redox state , oxidized protein removal , and the ubiquitin – proteasome system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 664–670, 2011.

MARTINEZ-PASTOR, M. T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO Journal**, v. 15, p. 2227– 2235, 1996.

MCGUIRE, S. E. et al. Chromosomal assignments of human 27-kDa heat shock protein gene family. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 167–171, 1989.

MCKINNON, C.; TABRIZI, S. J. The Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegeneration. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 17, p. 1, 2014.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. DA. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181–188, 1999.

MORLEY, J. F.; MORIMOTO, R. I. Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. February, p. 657–664, 2004.

MOTSHWENE, P. et al. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp12 (heat-shock

protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Journal**, v. 377, p. 769–774, 2004.

MÜLLER, I. et al. Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 12, p. 47–52, 1980.

MUMBERG, D.; MAILER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, p. 119–122, 1995.

MURSHID, A.; EGUCHI, T.; CALDERWOOD, S. K. Stress proteins in aging and life span. **International Journal of Hyperthermia**, v. 6736, p. 1–6, 2013.

MYMRIKOV, E. V; SEIT-NEBI, A. S.; GUSEV, N. B. Large Potentials of Small Heat Shock Proteins. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1123–1159, 2011.

NÉRI, A. L. Contribuições da psicologia ao estudo e à intervenção no campo da velhice. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, v. 1, n. 1, p. 69–80, 2004.

NEVOIGT, E. et al. Engineering of Promoter Replacement Cassettes for Fine-Tuning of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5266–5273, 2006.

NIETO-SOTELO, J. et al. The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. **Cell**, v. 62, p. 807–817, 1990.

OUTEIRO, T. F. et al. Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 351, n. 3, p. 631–8, 2006.

PARASKEVAKOU, G. et al. Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in Lentiviral-based Rat Models of Huntington's Disease. **Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 15, n. 4, p. 677–686, 2007.

PARCELLIER, A. et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 16, p. 5790–5802, 2003.

PARCELLIER, A. et al. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. **The FASEB journal : official**

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 20, n. 8, p. 1179–1181, 2006.

PARK, S. W. et al. Human heat shock protein 27-overexpressing mice are protected against acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 297, n. 4, p. F885–F894, 2009.

PARK, U. P.; MCVEY, M.; GUARENTE, L. Separation of Mother and Daughter Cells. **Methods in enzymology**, v. 351, 2002.

PARRELLA, E.; LONGO, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. **Methods**, v. 46, n. 4, p. 256–262, 2008.

PETRANOVIC, D.; NIELSEN, J. Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease ? **Trends Biotechnol**, v. 26, n. September, p. 584–90, 2008.

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alfa-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, v. 276, n. June, p. 2045–2047, 1997.

PRIDE, H. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Long-lived species have improved proteostasis compared to phylogenetically-related shorter-lived species. **Biochemical and biophysical research communications**, v. xxx, n. January, p. 1–7, 2015.

RILEY, J. C. Estimates of Regional and Global Life Expectancy, 1800–2001. **POPULATION AND DEVELOPMENT REVIEW**, v. 31, n. 3, p. 537–543, 2005.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Free Radical Biology & Medicine Extending life span by increasing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 327–336, 2011.

RODRIGUEZ, K. A. et al. Determinants of rodent longevity in the chaperone-protein degradation network. **Cell Stress and Chaperones**, 2016.

ROGALLA, T. et al. Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor α by Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18947–18956, 1999.

SAKAMOTO, H. et al. Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45770–

45775, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SARTO, C.; BINZ, P. A.; MOCARELLI, P. Heat shock proteins in human cancer. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1218–1226, 2000.

SCHMITT, A. P.; MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5777–5782, 1996.

SEMCHYSHYN, H. M.; VALISHKEVYCH, B. V. Hormetic Effect of H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* : Involvement of TOR and Glutathione Reductase. **Dose-Response: An International Journal**, n. June, p. 1–12, 2016.

SIQUEIRA, R. L.; BOTELHO, M. I. V.; COELHO, F. M. G. A velhice : algumas considerações teóricas e conceituais. **Ciencia & saude coletiva**, v. 7, n. 4, p. 899–906, 2002.

SORGER, P. K.; LEWIS, M. J.; PELHAM, H. R. B. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. **Nature**, v. 329, p. 81–84, 1997.

SORGER, P. K.; PELHAM, H. R. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. **Cell**, v. 54, p. 855– 864, 1988.

STROMER, T. et al. Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18015–18021, 2003.

TANAKA, K. Review The proteasome : Overview of structure and functions. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 85, n. Ser B, p. 12–36, 2009.

TANAKA, K.; MIZUSHIMA, T.; SAEKI, Y. The proteasome : molecular machinery and pathophysiological roles. **Biological Chemistry**, v. 393, n. April, p. 217–234, 2012.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, 2010.

THROWER, J. S. et al. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. **EMBO Journal**, v. 19, n. 1, p. 94–102, 2000.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. I. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 101–109, 2011.

TREGER, J. M. et al. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 26875–26879, 1998.

TSAKIRI, E. N.; TROUGAKOS, I. P. The amazing ubiquitin-proteasome system: Structural components and implication in aging. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 314, p. 171–237, 2015.

VERGHESE, J. et al. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones : Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 115–158, 2012.

VERMA, R. et al. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 10, p. 3425–3439, 2000.

VOS, M. J. et al. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. **Aging Cell**, v. 15, p. 217–226, 2016.

VOS, M. J.; KANON, B.; KAMPINGA, H. H. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 8, p. 1343–1353, 2009.

WANG, H.-D.; KAZEMI-ESFARJANI, P.; BENZER, S. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12610–12615, 2004.

WEI, M. et al. Tor1/Sch9-Regulated Carbon Source Substitution Is as Effective as Calorie Restriction in Life Span Extension. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 5, 2009.

WEI, M.; MADIA, F.; LONGO, V. D. Studying Age-dependent Genomic Instability using the *S. cerevisiae* Chronological Lifespan Model. **Journal of Visualized Experiments**, n. September, p. 2–6, 2011.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. March, p. 169–178, 2001.

WELKER, S. et al. Article Hsp12 Is an Intrinsically Unstructured Stress Protein that Folds upon Membrane Association and Modulates Membrane Function. **Molecular Cell**, v. 39, n. 4, p. 507–520, 2010.

WHO. World report on ageing and health. **World Health Organization**, 2015.

WIEDERRECHT, G.; SETO, D.; PARKER, C. S. Isolation of the gene encoding the S. cerevisiae heat shock transcription factor. **Cell**, v. 54, p. 841– 853, 1988.

WU, Z. et al. A high throughput screening assay for determination of chronological lifespan of yeast. **Experimental Gerontology**, v. 46, p. 915–922, 2011.

ANEXO 1

Sequencias dos gBlock® sintetizados

gBlock® 1

Promotor *TEF* (-52 a -1)

AAGGAGTACT

TGTTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACTATAATTA ACTAAAC

Sequencia codificadora *HSP27* (+1 a +369)

ATG ACT GAA AGA AGA GTT CCT TTC TCT CTA TTG CGT GGC CCA AGT TGG
GAC CCC TTT AGA GAC TGG TAT CCA CAT TCC AGG CTA TTT GAT CAA GCA
TTT GGT CTA CCC AGA TTA CCA GAA GAA TGG TCA CAA TGG CTG GGT GGA
TCT TCT TGG CCA GGT TAC GTA AGA CCC CTA CCA CCG GCA GCT ATC GAG
TCA CCA GCA GTC GCT GCA CCT GCT TAT TCA AGA GCA TTA AGT CGT CAA
TTG TCT TCC GGT GTA TCC GAG ATA AGG CAT ACA GCA GAT CGT TGG AGG
GTT AGT TTG GAT GTC AAT CAC TTC GCG CCG GAC GAA CTA ACT GTG AAA
ACT AAG GAT GGG GTT GTG GAA ATC ACA GGA AAA

Fim do gBlock® 1

gBlock® 2

Região codificadora *HSP27* (+319 a 618)

50 pb para *overlap extension* PCR

AC GAA CTA ACT GTG AAA ACT AAG GAT GGG GTT GTG GAA ATC ACA GGA
AAA

CAT GAA GAA CGT CAA GAC GAA CAT GGT TAC ATC TCT AGA TGT TTC ACA
AGA AAG TAT ACA CTT CCT CCG GGT GTC GAC CCG ACT CAG GTT TCT TCT
TCT CTT TCA CCA GAG GGT ACG TTA ACC GTG GAA GCC CCA ATG CCG AAA
TTA GCC ACA CAA AGT AAT GAA ATT ACT ATT CCC GTT ACA TTT GAG TCC
CGT GCT CAA TTG GGC GGA CCT GAA GCA GCT AAA AGC GAC GAA ACA GCA
GCA AAA TAG

122bp do terminador *CYCI* (quarta base mutada de G para A)

ACAAGCCCCTTTTCCTTTGTCGATATCATG

TAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCGA
AAAG

GAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCC

Fim do gBlock® 2

ANEXO 2

Tabela 6 – Análises estatísticas dos experimentos de RLS. Valores de p foram avaliados pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.

Amostras	Vetor
WT	Ns
TEF 1'	*
TEF 2'	***
TEF 3'	*
TEF 4'	*
TEF 5'	*
TEF nativo	*
TEF 6'	**
TEF 7'	*
TEF 8'	***
TEF 9'	*

Hipóteses dos testes: Coluna Vetor versus vetor e TEF-HSP27, TEF≠Vetor,
ns: não significativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$

Tabela 7 – Análises estatísticas dos experimentos de ensaio proteassomal. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.

HSP27+	Vetor	
Promotor TEF	7 dias	14 dias
TEF 1'	ns	*
TEF 2'	ns	*
TEF 3'	ns	ns
TEF 4'	ns	*
TEF 5'	ns	*
TEF nativo	*	*
TEF 6'	ns	*
TEF 7'	ns	*
TEF 8'	ns	**
TEF 9'	ns	*

Hipóteses dos testes: Coluna Vetor versus TEF-HSP27, TEF≠Vetor,
ns: não significativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$

Tabela 8 – Análises estatísticas dos experimentos do ensaio de estresse oxidativo. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.

HSP27+ Promotor TEF	Vetor		
	0,5 mM	0,75 mM	1 mM
TEF 1'	*	***	ns
TEF 2'	ns	**	ns
TEF 3'	**	**	ns
TEF 4'	ns	**	ns
TEF 5'	*	**	ns
TEF nativo	*	ns	ns
TEF 6'	***	***	**
TEF 7'	**	**	**
TEF 8'	*	***	**
TEF 9'	*	**	**

Hipóteses dos testes: Coluna Vetor versus TEF-HSP27, TEF≠Vetor,
ns: não significativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$

Tabela 9 – Análises estatísticas dos experimentos do ensaio de choque térmico. Valores de p foram avaliados pelo teste t student não pareado comparando-se as células WT com as células HSP27 sob expressão dos promotores mutantes TEF.

Amostras	Vetor
Vetor	Ns
TEF 1'	***
TEF 2'	**
TEF 3'	*
TEF 4'	*
TEF 5'	ns
TEF nativo	***
TEF 6'	*
TEF 7'	ns
TEF 8'	***
TEF 9'	*

Hipóteses dos testes: Coluna Vetor versus TEF-HSP27, TEF≠Vetor,
ns: não significativo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$