

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ANGELICA RAMOS

Funções da dupla localização da 1-Cys Peroxirredoxina (Prx1)
em mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*

Functions of 1-Cys Peroxiredoxin (Prx1) dual localization in
Saccharomyces cerevisiae mitochondria

São Paulo
2023

ANGELICA RAMOS

Funções da dupla localização da 1-Cys Peroxirredoxina (Prx1)
em mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*

Functions of 1-Cys Peroxiredoxin (Prx1) dual localization in
Saccharomyces cerevisiae mitochondria

Versão simplificada

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências, na Área de Biologia Genética.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo S. Netto

Co-orientador: Dr. Fernando Gomes

São Paulo

2023

FICHA CATALOGÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Ramos, Angelica
Funções da dupla localização da 1-Cys
Peroxirredoxina (Prx1) em mitocôndrias de
Saccharomyces cerevisiae / Ramos Angelica ;
orientador Luis Eduardo S. Netto ; coorientador
Fernando Gomes -- São Paulo, 2023.
92 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. Saccharomyces cerevisiae. 2. Peroxirredoxina
1. 3. Mitocôndria. 4. H2O2. I. , Luis Eduardo S.
Netto, orient. II. , Fernando Gomes, coorient.
Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

RESUMO

As mitocôndrias são organelas encontradas nas células eucarióticas, compostas por quatro subcompartimentos distintos: a matriz, a membrana interna, o espaço intermembranas e a membrana externa. As mitocôndrias desempenham uma variedade de processos fisiológicos essenciais, incluindo a síntese de uma grande parte do ATP por meio da fosforilação oxidativa. Durante este processo, ocorre um consumo significativo de O_2 , que é reduzido a água por elétrons provenientes da cadeia respiratória, localizada na membrana interna. No entanto, esse processo também pode gerar espécies reativas de oxigênio devido a reduções incompletas do O_2 . A proteína antioxidante que estamos investigando é a 1-Cys Peroxirredoxina 1 (Prx1), presente em *S. cerevisiae* e homóloga à Prx3 humana. A Prx1 está localizada na mitocôndria e tem a capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água por meio de sua atividade peroxidásica dependente de tiol. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a Prx1 está presente em dois subcompartimentos mitocondriais: na matriz e no espaço intermembranas (IMS), sendo direcionada para essas regiões por meio de sinais de importação encontrados em sua porção N-terminal. O objetivo deste estudo foi compreender os papéis fisiológicos desempenhados pela Prx1 nesses subcompartimentos. Para alcançar esse objetivo, construímos linhagens de levedura que expressam a Prx1 exclusivamente na matriz (M-Prx1) ou no espaço intermembranas (IMS-Prx1) e comparamos fenótipos derivados dessas linhagens com os fenótipos correspondentes às linhagens WT e Δ Prx1. Nossos resultados revelaram que, de uma forma geral, as linhagens apresentaram maior resistência aos oxidantes quando cultivadas em meio contendo glicose (condições fermentativas), em comparação com o meio contendo glicerol/etanol (condições respiratórias), sendo que IMS-Prx1 e Δ Prx1 apresentaram uma sensibilidade significativamente maior ao H_2O_2 em comparação com a linhagem WT e a M-Prx1. Esses dados sugerem que, quando está reduzido, o resíduo C38 da Prx1 pode estar envolvido na importação da Prx1. Em conclusão, a resposta celular ao estresse oxidativo destaca a importância da Prx1 na proteção contra os danos induzidos por peróxidos. Além disso, evidenciam a interconexão entre diferentes vias de sinalização e a regulação complexa da expressão da Prx1.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Peroxirredoxina 1. Mitocôndria. H_2O_2 .

ABSTRACT

Mitochondria are organelles found in eukaryotic cells, composed of four distinct subcompartments: matrix, inner mitochondrial membrane, the intermembrane space (IMS), and the outer mitochondrial membrane. Mitochondria play a variety of essential physiological processes, including the synthesis of a large portion of ATP through oxidative phosphorylation. During this process, there is a significant consumption of molecular oxygen, which is reduced to water by electrons from the respiratory chain, located in the inner membrane. However, this process can also generate reactive oxygen species due to incomplete reductions of molecular oxygen. The antioxidant protein we are investigating is the 1-Cys Peroxiredoxin 1 (Prx1), present in *S. cerevisiae* and homologous to human Prx3. Prx1 is located in the mitochondria and has the ability to reduce hydrogen peroxide (H_2O_2) to water through its thiol-dependent peroxidase activity. Our research group has demonstrated that Prx1 is present in two mitochondrial subcompartments: the matrix and the IMS, being targeted to these regions through import signals found in its N-terminal portion. The aim of this study was to understand the physiological roles played by Prx1 in these mentioned subcompartments. To achieve this goal, we constructed yeast strains that exclusively express Prx1 in the matrix (M-Prx1) or the IMS (IMS-Prx1), and compared the phenotypes derived from these strains with the corresponding phenotypes of WT and Δ Prx1 strains. Overall, our results revealed that the strains showed increased resistance to oxidants when cultured in glucose-containing medium (fermentative conditions) compared to glycerol/ethanol-containing medium (respiratory conditions), while IMS-Prx1 and Δ Prx1 exhibited significantly higher sensitivity to H_2O_2 compared to the WT and M-Prx1 strains. These data suggest that, when in the reduced state, the C38 residue of Prx1 may be involved in Prx1 import. In conclusion, the cellular response to oxidative stress highlights the importance of Prx1 in protection against peroxide-induced damage. Furthermore, it underscores the interconnection between different signaling pathways and the complex regulation of Prx1 expression.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Peroxiredoxin 1. Mitochondria. H_2O_2 .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura mitocondrial	19
Figura 2. Sistema de fosforilação oxidativa.....	21
Figura 3. Estrutura do complexo de Translocase de membrana Externa	23
Figura 4. Maquinaria de importação das proteínas mitocondriais.....	24
Figura 5. Formação de O_2^- e H_2O_2	31
Figura 6. Ciclo catalítico das Prxs	33
Figura 7. Estrutura geral da proteína N48ScPrx1	35
Figura 8. Modelo esquemático do envolvimento de TOR quinase e PKA na regulação da expressão de Prx1 da levedura <i>S. cerevisiae</i>	37
Figura 9. Mecanismo de importação mitocondrial da proteína Prx1 em <i>S. cerevisiae</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP - *Adenosine Triphosphate*
- ELA - *Esclerose Lateral Amiotrófica*
- EROs - *Espécies Reativas de Oxigênio*
- FALS - *Familiar Amiotrofic Lateral Sclerosis*
- Fe-S - *Iron-Sulfur Cluster*
- IMM - *Inner Mitochondrial Membrane*
- IMS - *Intermembrane Space*
- MIA - *Mitochondrial Import and Assembly*
- MICOS - *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*
- MIM - *Mitochondrial Import Membrane*
- MPP - *Mitochondrial Processing Peptidase*
- mtDNA - *Mitochondrial DNA*
- Nde - *NADH desidrogenase externa*
- Ndi - *NADH desidrogenase interna*
- OMM - *Outer Mitochondrial Membrane*
- PAM - *Presequence Translocase-Associated Motor*
- PK - *Proteinase K*
- PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- SALS - *Sporadic Amiotrofic Lateral Sclerosis*
- SAM - *Sorting and Assembly Machinery*
- SH - *Grupos Tiól*
- SOD - *Superoxide Dismutase*
- TIM - *Translocase of the Inner Membrane*
- TOM - *Translocase of the Outer Membrane*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MITOCÔNDRIA.....	15
1.2 ESTRUTURA DA MITOCÔNDRIA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.3 MECANISMOS DE IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS.....	22
1.3.1 Complexo Translocase de Membrana Externa	22
1.3.2 Mecanismo Dobramento Oxidativo	23
1.3.3 Mecanismo Pré-sequência	25
1.3.4 Mecanismo Parada de Transferência	26
1.3.5 Mecanismo Transportador	27
1.3.6 Mecanismo barril-β	27
1.3.7 Complexo de importação mitocondrial	28
1.4 OXIDANTES.....	28
1.4.1 Superóxido	29
1.4.2 Peróxido de Hidrogênio	30
1.5 PEROXIRREDOXINAS (Prxs).....	32
1.6.1 Expressão dos genes de Prx1	36
1.6.2 Localização da Prx1	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MITOCÔNDRIA

A hipótese da origem mitocondrial propõe que esse processo ocorreu em várias etapas e envolveu organismos intermediários que, provavelmente, estão extintos. Esse processo foi marcado pela absorção de uma α -proteobactéria por um precursor da célula eucariótica moderna (MARGULIS, 1970; SAGAN, 1967). Esse evento foi possibilitado, em grande parte, pelo surgimento de centenas de novos genes relacionados a sistemas de importação de proteínas, inserção de transportadores de membrana, integração do metabolismo e reprodução, além da redução do genoma e a transferência de genes endossimbióticos para o núcleo (MARGULIS, 1976; MARTIN; HERRMANN, 1998; ZIMORSKI et al., 2014).

Apesar de ainda haver incertezas sobre a natureza do endossimbionte inicial, é claro que as mitocôndrias foram selecionadas devido à sua capacidade de gerar Adenosina Trifosfato (ATP) de maneira eficiente por meio da respiração aeróbica. O desenvolvimento de sistemas de importação de proteínas nas mitocôndrias foi crucial para o sucesso dessa simbiose, permitindo a troca de genes entre a célula hospedeira e a mitocôndria. Com o tempo, as mitocôndrias se especializaram como organelas produtoras de energia para a célula hospedeira, desempenhando também papéis adicionais em uma infinidade de vias metabólicas e biossintéticas (MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015; ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017).

Essa associação simbiótica entre a célula eucariótica e as mitocôndrias foi um marco evolutivo crucial que permitiu o desenvolvimento de organismos complexos. A capacidade das mitocôndrias de produzir ATP eficientemente por meio da respiração aeróbica possibilitou um aumento significativo da energia disponível para as células hospedeiras, o que viabilizou a evolução de funções celulares mais elaboradas. Além disso, a transferência de genes do genoma mitocondrial para o núcleo da célula hospedeira, contribuiu, ao longo do tempo, para a evolução e diversificação dos eucariotos.

A hipótese da origem mitocondrial, proposta pela cientista Lynn Margulis na década de 1960, revolucionou nossa compreensão sobre a evolução das células eucarióticas. Essa teoria enfatiza a importância das associações simbióticas na evolução biológica, mostrando como a cooperação entre diferentes organismos pode levar a mudanças significativas e à emergência de novas formas de vida. Atualmente,

a origem mitocondrial é amplamente aceita e suportada por evidências científicas, e continua a ser um tópico de pesquisa fascinante e em constante evolução na biologia evolutiva.

Atualmente, a mitocôndria é uma organela presente na maioria dos organismos eucarióticos, desempenhando papéis fundamentais em suas atividades celulares. No entanto, há exceções, como algumas células que não possuem essa organela em sua constituição (KARNKOWSKA et al., 2016). Nas células que possuem mitocôndrias, elas são mais conhecidas por serem as "usinas de energia" da célula, onde ocorre a respiração aeróbica. Esse processo envolve a metabolização do piruvato, que é produzido na glicólise, em dióxido de carbono (CO_2), gerando elétrons que, em geral, impulsionam a cadeia de transporte de elétrons, resultando na síntese de ATP (NELSON; COX, 2011; SARASTE, 1999).

No entanto, ao longo do século passado, evidências científicas mostraram que as mitocôndrias desempenham outras funções além da produção de energia, e essas funções podem variar entre os diferentes grupos de eucariotos (ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017). As mitocôndrias estão envolvidas em uma ampla gama de processos metabólicos e biossintéticos, desempenhando papéis cruciais na homeostase celular e no equilíbrio energético. Além da respiração aeróbica, as mitocôndrias estão envolvidas na regulação do metabolismo lipídico, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), na síntese de aminoácidos e nucleotídeos, na regulação do cálcio intracelular, na apoptose (morte celular programada) e em outras vias metabólicas essenciais (ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017; WALLACE, 2012).

Essa diversidade de funções mitocondriais é resultado da evolução e especialização dessas organelas ao longo do tempo. Durante a simbiose primordial que deu origem às mitocôndrias, houve uma transferência de genes do genoma mitocondrial para o genoma nuclear do hospedeiro, levando a uma cooperação e compartilhamento de funções entre as mitocôndrias e a célula hospedeira. Essa colaboração evolutiva permitiu que as mitocôndrias se tornassem organelas multifuncionais, desempenhando papéis vitais na fisiologia celular.

Além disso, estudos recentes revelaram que as mitocôndrias também estão envolvidas na comunicação celular, participando de complexas interações com outras organelas, como o retículo endoplasmático e o peroxissomo. Essas interações

desempenham um papel importante na regulação do metabolismo, na resposta a estresses celulares e no equilíbrio redox (REUBER et al., 2018; HONDA et al., 2018).

Portanto, as mitocôndrias são organelas multifacetadas que desempenham funções além da produção de energia. Elas são essenciais para a manutenção da homeostase celular, participando de processos metabólicos e de sinalização que são vitais para a sobrevivência e funcionamento adequado dos organismos eucarióticos. O estudo contínuo das mitocôndrias e de suas funções em diferentes organismos e condições é fundamental para uma compreensão mais completa do papel dessas organelas na biologia e na saúde humana.

A mitocôndria participa da homeostase do cálcio (KOWALTOWSKI et al., 2019), do metabolismo de aminoácidos (GUDA; GUDA; SUBRAMANIAM, 2007; LI; HOPPE, 2023), lipídios (BENADOR et al., 2019; CHANDEL, 2021), na regulação da via intrínseca da morte celular por apoptose (BURKE, 2017), além da formação de grupos de Ferro-Enxofre (Fe-S) (LILL; FREIBERT, 2020; READ et al., 2021). Para exercer essas diversas funções, as mitocôndrias dependem de complexos sistemas de importação de proteínas, já que os sistemas próprios de replicação, transcrição e tradução mitocondriais são responsáveis pela síntese de apenas uma pequena quantidade de proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) (BECKER; SONG; PFANNER, 2019; BOHNERT; PFANNER; VAN DER LAAN, 2015), as quais fazem parte da cadeia respiratória.

Devido as múltiplas funções da mitocôndria, diversas patologias incluindo a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e Huntington podem estar intimamente relacionadas com o comprometimento da função dessa organela. A Doença de Alzheimer ocorre pela presença de placas senis compostas principalmente pelo peptídeo β -amiloide e emaranhados neurofibrilares compostos principalmente pela proteína *tau* hiperfosforilada. Neste sentido, o dano oxidativo e a disfunção mitocondrial provavelmente contribuem para a patologia desta doença (NUNOMURA et al., 2001). A mitocôndria mostrou-se relevante para a Doença de Parkinson quando a deficiência do complexo I da cadeia respiratória e a depleção de glutatona foram observados na substância negra de pacientes com Doença de Parkinson idiopática e em pacientes com DP pré-sintomáticos (SCHAPIRA et al., 1989). A ELA se caracteriza por apresentar degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores no córtex, tronco cerebral e medula espinhal causando fraqueza progressiva, atrofia e espasticidade do tecido muscular. Dos casos

familiares, 20% são causados por mutações na enzima Superóxido dismutase dependente de Cu/Zn (Sod1) e pela regulação da importação desta enzima realizada pela proteína Importação Mitocondrial e Montagem 40 (Mia40 - *Mitochondrial Import and Assembly 40*) (comentada a seguir) e pelo complexo Sistema de Organização das Cristas e Local de Contato Mitocondrial (MICOS - *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*) (FRIDOVICH, 1995; LIN; BEAL, 2006; VALENTINE; DOUCETTE; POTTER, 2005).

Outra doença relacionada com a deficiência mitocondrial, mais precisamente, com a importação de proteínas mitocondriais é a Síndrome de Surdez e Dystonia Neurodegenerativa causada por uma mutação no gene da proteína DPP1 (KOEHLER et al., 1999). Foi demonstrado que a troca do resíduo de cisteína na posição 66 por um triptofano (C66W) resulta na impossibilidade da proteína de sofrer o dobramento oxidativo, ainda que possa ser importada para o espaço intermembranas (IMS - *Intermembrane Space*). Desse modo, a proteína que é um substrato da oxirredutase Mia40, torna-se incapaz de formar um complexo com sua parceira, a Translocase de membrana interna 13 (Tim13 - *Translocase of the Outer Membrane*), e conseqüentemente ocorre a perda da função proteica provocando o Distúrbio de Huntington que é caracterizado por sintomas como: movimento descoordenado dos músculos, depressão e estresse (HOFMANN et al., 2002; NAPOLI et al., 2013).

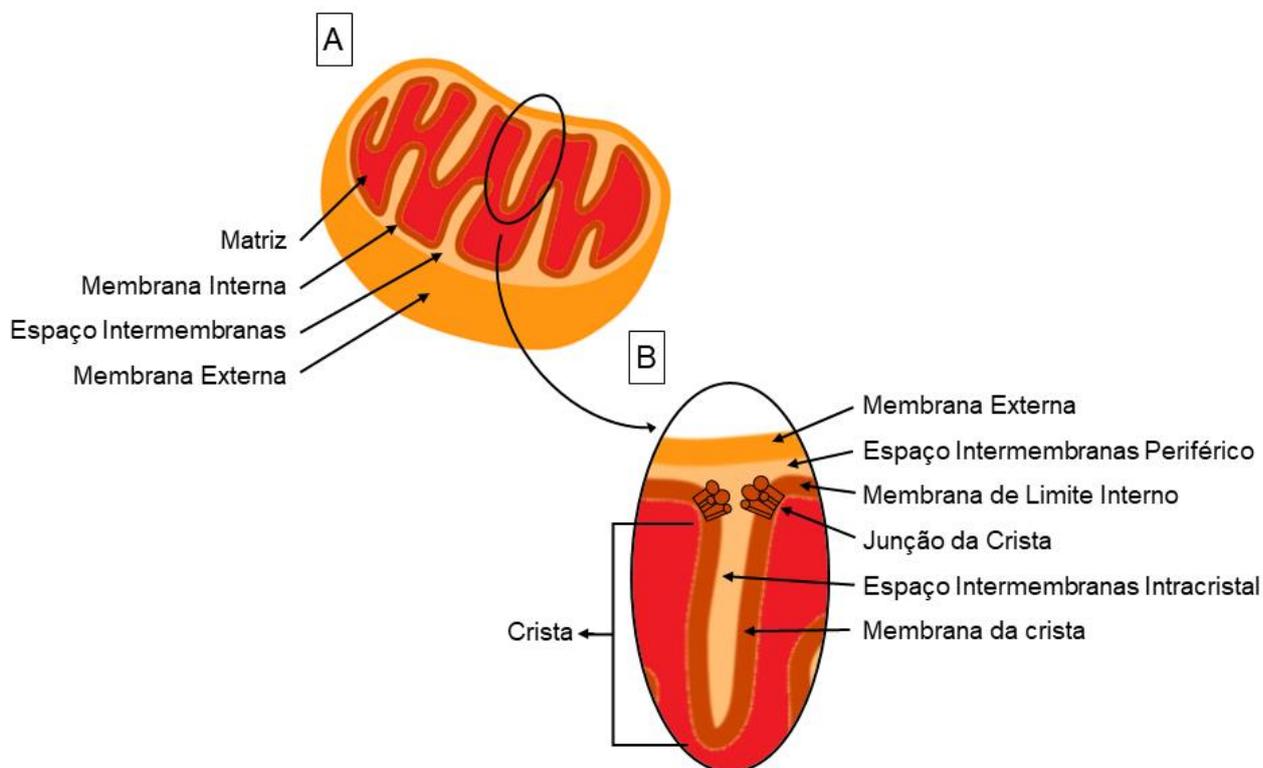
Embora a relação entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e doenças neurodegenerativas seja complexa e ainda não totalmente compreendida, evidências crescentes indicam que esses processos desempenham um papel central na patogênese dessas doenças. A compreensão desses mecanismos pode abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas que visem preservar a função mitocondrial e mitigar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo nas doenças neurodegenerativas.

1.2 ESTRUTURA DA MITOCÔNDRIA DE *Saccharomyces cerevisiae*

As mitocôndrias de levedura possuem um tamanho aproximado de 0,1 - 0,7 μm de largura e 1 - 2 μm de comprimento (JIANG et al., 2010; RAFELSKI et al., 2012; SEEL et al., 2021) e são estruturalmente compostas por quatro compartimentos: a Membrana Mitocondrial Externa (OMM - *Outer Mitochondrial Membrane*), o IMS e a Membrana Mitocondrial Interna (IMM - *Inner Mitochondrial Membrane*) que por sua

vez, delimita uma matriz densa e rica em proteínas (figura 1) (FREY; MANNELLA, 2000).

Figura 1. Estrutura mitocondrial



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de HERRMANN; RIEMER, 2010.

A) Ilustração esquemática de uma mitocôndria e seus subcompartimentos: matriz, membrana interna, IMS e membrana externa. B) Crista mitocondrial com destaque para a subcompartimentalização do IMS em Espaço Intermembranas Periférico e Espaço Intermembranas Intracristal.

A OMM é a camada mais externa da mitocôndria, envolvendo e protegendo os compartimentos internos. Ela é permeável a pequenas moléculas e íons e contém uma variedade de proteínas transportadoras que regulam a entrada e saída de substâncias. Esta estrutura também desempenha um papel importante na comunicação entre a mitocôndria e o restante da célula. Devido a presença de porinas, que possuem estrutura relativamente rígida na forma de barril β , a passagem de moléculas com massa de 5 a 6 kDa é permitida com baixa seletividade (O'ROURKE, 2007). Estas estruturas são evolutivamente conservadas estando presentes nas membranas externas de bactérias, dos plastídios, e das mitocôndrias (COLOMBINI, 2004). Porém, diferentemente do que se pensava, as porinas não permitem a difusão

de quaisquer moléculas, sendo capazes de regular este transporte (GREVEL; BECKER, 2020). Além das porinas, a membrana mitocondrial externa possui translocases e chaperonas multiproteicas, dentre elas a Translocase De Membrana Externa (TOM - *Translocase of the Outer Membrane*) a qual participa da importação de proteínas mitocondriais que são codificadas no núcleo e traduzidas no citosol.

A IMM foi descrita após o advento da microscopia eletrônica, quando foi possível observar as invaginações desta membrana formando cristas (ZICK; RABL; REICHERT, 2009). Esta descrição foi interpretada como uma extensão da membrana interna, aumentando, assim, a área de superfície (PALADE, 1952). Contudo, sabe-se hoje que a membrana interna é separada em duas regiões: membrana interna periférica e membrana da crista (VAN DER LAAN et al., 2012; VAN DER LAAN; HORVATH; PFANNER, 2016; VOGEL et al., 2006; WURM; JAKOBS, 2006).

A membrana interna periférica está localizada paralelamente à membrana externa e abriga a maioria dos complexos proteicos envolvidos na importação de proteínas (COLINA-TENORIO et al., 2020; RAMPELT et al., 2017). Por outro lado, nas membranas da crista, localiza-se o sistema de fosforilação oxidativa, contendo os complexos da cadeia respiratória e a ATP sintase (KONDADI; ANAND; REICHERT, 2020).

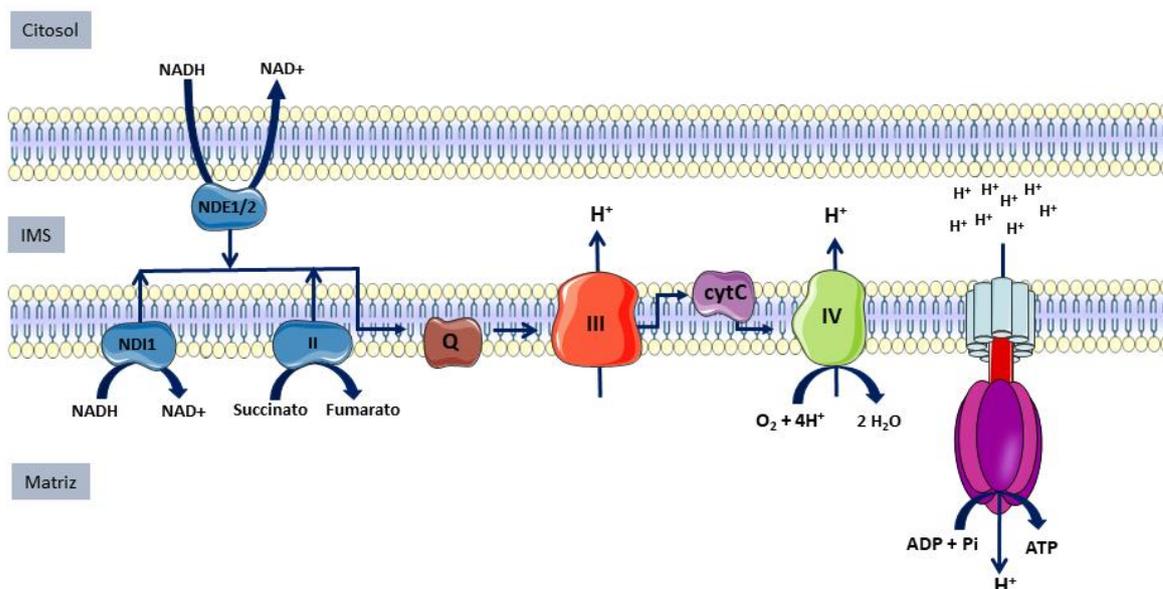
Além disso, há pequenas estruturas tubulares chamadas de junções das cristas que separam as membranas da crista da membrana interna periférica. Esta estrutura parece ser de tamanho uniforme nos diversos organismos, tecidos e condições celulares, diferentemente como ocorre com a abundância e forma das cristas. Ainda, atuam como uma barreira de difusão dinâmica entre o espaço intermembrana intracristal e o espaço intermembrana periférico (KONDADI; ANAND; REICHERT, 2020; MANNELLA, 2006; RAMPELT et al., 2017).

Em *S. cerevisiae*, o sistema de fosforilação oxidativa é muito similar à dos eucariotos superiores (figura 2). Contudo há uma diferença significativa: *S. cerevisiae* não possui o complexo I similar ao de mamíferos. No lugar dele há três NADH desidrogenases situadas em ambos os lados da IMM chamadas NADH Desidrogenase Externa 1 e 2 (Nde1 e Nde2) e NADH Desidrogenase Interna 1 (Ndi1), que promovem o acoplamento da oxidação do NADH com a redução da coenzima Q. Ademais, as NADH desidrogenases não são capazes de bombear os prótons para o IMS durante o transporte de elétrons através da cadeia. Após a coenzima Q ser reduzida por essas NADH desidrogenases alternativas, as reações subsequentes são

semelhantes à cadeia transportadora de elétrons de eucariotos superiores (figura 2) (JOSEPH-HORNE; HOLLOWAY; WOOD, 2001).

O IMS é um pequeno subcompartimento, localizado entre as membranas externa e interna da mitocôndria, de aproximadamente 60 nm de diâmetro (FREY; MANNELLA, 2000). Este compartimento é essencial para a função mitocondrial atuando como um tampão entre o citosol e a matriz por meio da troca e manutenção de metabólitos, lipídios, proteínas, metais e outros cofatores enzimáticos necessários para a função mitocondrial, bem como a regulação redox (EDWARDS; GERLICH; TOKATLIDIS, 2020).

Figura 2. Sistema de fosforilação oxidativa



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de HERRERO et al., 2008.

Representação esquemática dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial de *S. cerevisiae* a qual fazem parte: NDE1/2, NDI1, II (complexo respiratório II), Q (coenzima Q), III (complexo respiratório III), *cytC* (citocromo *c*) e IV (complexo respiratório IV), e entre eles, as setas indicando o curso dos elétrons. O gradiente eletroquímico gerado pela transferência de elétrons, derivados do NADH e do succinato, impulsiona a síntese de ATP por meio do complexo da ATP-sintase.

Em decorrência da junção da crista, ocorre uma segregação do IMS em duas regiões distintas fisiologicamente. As junções da crista criam um subcompartimento do IMS (espaço intracristal) (figura 1), limitando o vazamento de prótons para o citosol, potencializando a síntese de ATP pela ATP sintase. Além disso, a formação de EROs

pela cadeia respiratória é limitada ao espaço intracristal (figura 1), por conseguinte, minimizando danos à organela. Ainda, a membrana externa permite que o IMS seja notavelmente diferente do citosol. Estudos mostraram que o IMS é de 0,2 a 0,7 unidades de pH mais ácido que o citosol (CORTESE; VOGLINO; HACKENBROCK, 1992; PORCELLI et al., 2005). Além disso, o IMS é mais oxidativo, comparado com o citosol e a matriz, podendo ser explicado pelo fato de que as junções da crista podem limitar o acesso da glutatona à intracrista, resultando em uma razão maior de glutatona oxidada para a reduzida nesse subcompartimento (HERRMANN; RIEMER, 2010; HU; DONG; OUTTEN, 2008).

1.3 MECANISMOS DE IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS

A mitocôndria de *S. cerevisiae* apresenta mais de 900 proteínas (VÖGTLE et al., 2017). Desse montante, cerca de 99% são codificadas por genes nucleares. O restante, aproximadamente 1%, são codificadas pelo mtDNA. Dentre as 8 proteínas codificadas pelo mtDNA em levedura, quatro são subunidades dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, 3 da ATP sintase e uma proteína ribossomal (BECKER; SONG; PFANNER, 2019; VÖGTLE et al., 2009, 2017). As proteínas codificadas no núcleo são, em sua maioria, importadas de maneira pós-traducional para a mitocôndria (BECKER; SONG; PFANNER, 2019; MOULIN; CAUMONT-SARCOS; IEVA, 2019; SCHMIDT; PFANNER; MEISINGER, 2010).

A importação das proteínas mitocondriais é mediada por complexos multiproteicos, que reconhecem as proteínas precursoras e as direcionam para os diferentes compartimentos da mitocôndria (BAUSEWEIN et al., 2011; MOHD; SAYYED; MAHALAKSHMI, 2022). Neste sentido, os mecanismos de importação de proteínas mitocondriais serão descritos a seguir.

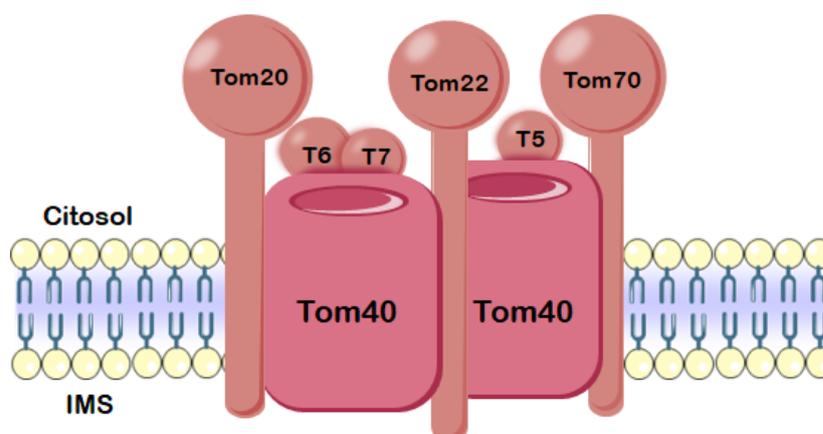
1.3.1 Complexo Translocase de Membrana Externa

O complexo TOM compreende o portão de entrada das pré-proteínas para o interior da mitocôndria (figura 3). Ele é constituído por sete subunidades distintas: Tom40, Tom70, Tom20, Tom22, Tom5, Tom6 e Tom7 (ARAISSO et al., 2019; ARAISSO; ENDO, 2022; TUCKER; PARK, 2019).

O componente principal do complexo TOM é um poro condutor de proteínas constituído pela proteína barril- β Tom40. Esta subunidade forma um poro aquoso pelo qual as proteínas precursoras atravessam a membrana externa na forma de cadeias

polipeptídicas lineares, podendo adquirir uma conformação estendida ou de α -hélice. As subunidades Tom20, Tom22 e Tom70 são proteínas transmembranas que possuem domínios receptores que se projetam para o lado citosólico do complexo. Durante a importação, esses domínios receptores interagem com sinais de importação específicos presentes nas diferentes proteínas precursoras, facilitando a passagem das mesmas pelo poro de Tom40 (BOHNERT; PFANNER; LAAN 2015; MOULIN; CAUMONT-SARCOS; IEVA 2019).

Figura 3. Estrutura do complexo de Translocase de membrana Externa



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de BECKER; WAGNER, 2018.

O complexo TOM consiste nas proteínas receptoras Tom20, Tom70 e Tom22, as pequenas proteínas Tom5, Tom6 e Tom7, bem como Tom40 que compõe o poro central da translocase.

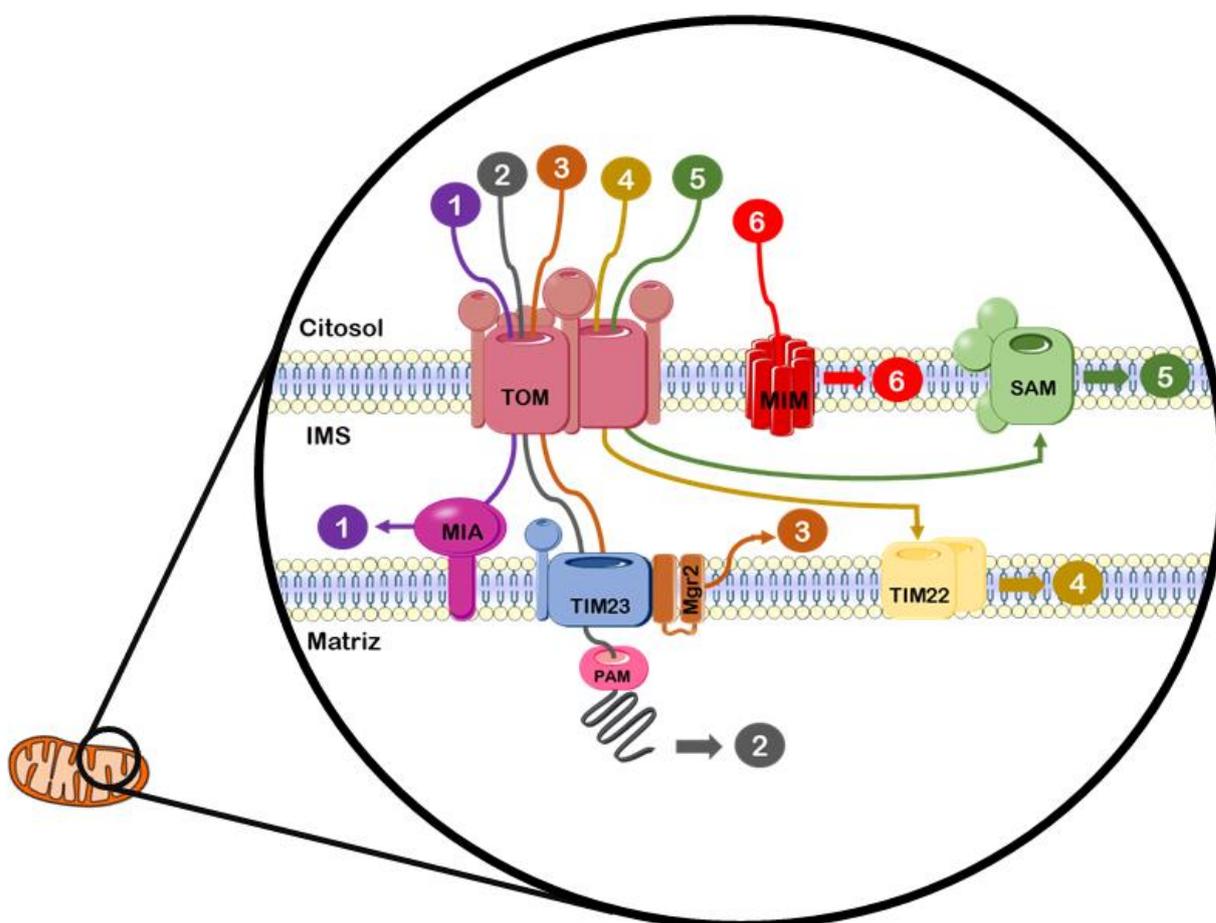
Por fim, as três pequenas subunidades Tom5, Tom6 e Tom7 promovem, junto com a Tom22, a montagem e estabilidade do complexo da translocase (BAUSEWEIN et al., 2011; GOLD et al., 2017; MOHD; SAYYED; MAHALAKSHMI, 2022; TUCKER; PARK, 2019; WIEDEMANN; PFANNER, 2017). Após a passagem pelo complexo TOM, as pré-proteínas são distribuídas aos distintos subcompartimentos mitocondriais através de mecanismos de importação específicos compostos por complexos proteicos especializados. Segue as descrições dos principais mecanismos de importação das proteínas mitocondriais.

1.3.2 Mecanismo Dobramento Oxidativo

O mecanismo de dobramento oxidativo (*oxidative folding pathway*) transporta as pré-proteínas para o IMS da mitocôndria que possuem pelo menos um resíduo de

cisteína na sua sequência (mecanismo 1, figura 4). Contudo, a grande maioria dessas pré-proteínas possuem motivos de cisteínas tais como: CX₃C e CX₉C, que formam ligações dissulfeto intramolecular (BANCI et al., 2008, 2009; EDWARDS; EAGLESFIELD; TOKATLIDIS, 2021). Antes de serem direcionadas ao IMS, as pré-proteínas são mantidas desdobradas e reduzidas no citosol. Após serem translocadas através do complexo TOM, essas pré-proteínas são reconhecidas pelo complexo MIA, a qual catalisa a oxidação dos resíduos de cisteínas das pré-proteínas, promovendo assim o seu enovelamento.

Figura 4. Maquinaria de importação das proteínas mitocondriais



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de BECKER; SONG; PFANNER, 2019 e WIEDEMANN; PFANNER, 2017.

Representação esquemática dos principais mecanismos de importação de proteínas mitocondriais. Os detalhes de cada mecanismo estão descritos no texto. 1) Mecanismo de Dobramento Oxidativo 2) Mecanismo Pré-sequência 3) Mecanismo Parada de Transferência 4) Mecanismo Transportador 5) Mecanismo barril-β 6) Mecanismo Importação Mitocondrial.

Conforme mencionado, o dobramento se dá por meio de uma maquinaria oxidativa, a qual fazem parte a oxidorreductase Mia40 e a flavoenzima Erv1. Após imergirem no IMS, as proteínas precursoras interagem com Mia40 por meio de interações hidrofóbicas e em seguida, um dos resíduos de cisteína da proteína precursora faz um ataque nucleofílico na ligação dissulfeto de Mia40, resultando na formação de uma ligação dissulfeto intermolecular entre a proteína precursora e Mia40. Segue-se então a formação de ligações dissulfetos intramoleculares na proteína precursora, liberando Mia40 no seu estado completamente reduzido. O processo é finalizado quando Erv1, uma sulfidril oxidase dependente de FAD, reoxida a Mia40, enviando os elétrons para o O₂ ou Citocromo c, em condições aeróbicas (MORDAS; TOKATLIDIS, 2015; RISSLER et al., 2005). Em condições anaeróbicas, a Erv1 forma um complexo com a proteína fumarato redutase, chamada Osm1, que catalisa a transferência de elétrons da Erv1 para o fumarato. Desse modo, tanto o citocromo c quanto fumarato atuam como receptores de elétrons da Erv1 (NEAL et al., 2017).

1.3.3 Mecanismo Pré-sequência

A importação da grande maioria das proteínas destinadas à matriz, de uma parcela significativa de proteínas da membrana interna mitocondrial e de um pequeno número de proteínas do IMS ocorre por meio de um processo conhecido como importação dependente de pré-sequência. As proteínas que utilizam essa rota de importação possuem uma sequência de endereçamento mitocondrial localizada predominantemente na região N-terminal, chamada de pré-sequência. O processo de importação começa com o reconhecimento sequencial dos elementos da pré-sequência pelos receptores do complexo TOM. Em seguida, as proteínas são transferidas para os receptores do complexo TIM23, que está localizado na membrana interna mitocondrial. Além disso, o complexo Motor Associado à Translocase da Pré-sequência (PAM) também atua nesse processo, auxiliando na translocação das proteínas através desses complexos para a matriz mitocondrial.

Após a translocação dos precursores proteicos para a matriz, a Peptidase de Processamento Mitocondrial (MPP) entra em ação, clivando a pré-sequência da proteína precursora. Isso permite que a proteína adote sua conformação nativa e desempenhe sua função específica dentro da mitocôndria. Esse mecanismo de importação dependente da pré-sequência desempenha um papel fundamental na

manutenção e funcionalidade das mitocôndrias, garantindo que as proteínas necessárias para as atividades metabólicas e estruturais sejam corretamente direcionadas e processadas dentro dessas organelas. (BACKES; HERRMANN, 2017; EDWARDS; GERLICH; TOKATLIDIS, 2020; MEIER; NEUPERT; HERRMANN, 2005; VÖGTLE et al., 2017; WIEDEMANN; PFANNER, 2017).

1.3.4 Mecanismo Parada de Transferência

As pré-proteínas que utilizam o Mecanismo Parada de Transferência (mecanismo 3 da figura 4), tem como destino final a membrana interna e/ou IMS. Esta via de importação foi uma das primeiras a serem descobertas e caracterizadas (GASSER et al., 1982; VAN LOON; SCHATZ, 1987). Uma característica marcante das pré-proteínas que utilizam esta via é possuir uma pré-sequência bipartida, ou seja, além da pré-sequência clivável descrita acima, possuem um segmento hidrofóbico posterior a pré-sequência. A importação dessas proteínas inicia-se por meio do reconhecimento dos elementos da pré-sequência pelas subunidades Tom20 e Tom22 do complexo TOM (EDWARDS; EAGLESFIELD; TOKATLIDIS, 2021; EDWARDS; GERLICH; TOKATLIDIS, 2020). Após imergirem no espaço intermembrana, os precursores são reconhecidos pelo complexo Tim23, o qual inicia a translocação das proteínas através da membrana interna. Durante esta etapa, as subunidades Tim23 e Mgr2 reconhecem sinais específicos das pré-proteínas que possuem pré-sequências bipartidas. Estes sinais são caracterizados principalmente pela presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente que flanqueiam o segmento hidrofóbico na região voltada para a matriz. Durante a translocação pelo poro proteico do complexo Tim23, o segmento hidrofóbico atua como um sinal de parada da translocação que impulsiona a liberação lateral da proteína precursora para o interior da bicamada lipídica da membrana interna (IEVA et al., 2014).

Para algumas proteínas, o sinal de parada da transferência (região hidrofóbica) faz parte da proteína madura e ancora a mesma na membrana interna. No entanto, para proteínas destinadas ao IMS, o sinal de parada da transferência é removido por um complexo proteico conhecido como Peptidase de Membrana Interna (IMP - *inner membrane peptidase*). Este complexo é composto pelas proteases Imp1 e Imp2, as quais possuem seus sítios catalíticos expostos em direção ao espaço intermembrana. Dessa forma, a clivagem do segmento hidrofóbico libera a proteína madura para o

espaço intermembrana (ESSER et al., 2004; GASSER et al., 1982; GLICK et al., 1992).

1.3.5 Mecanismo Transportador

A maioria das proteínas transportadas pelo Mecanismo Transportador são alocadas na membrana interna (mecanismo 4, figura 4). Esta via é composta por uma grande família de proteínas hidrofóbicas que contém segmentos transmembranares na forma de α -hélice. As pré-proteínas são sintetizadas sem uma pré-sequência clivável, contudo possuem elementos de direcionamento distribuídos pela sua estrutura primária, aos quais interagem com chaperonas citosólicas, como a Hsp70.

A proteína precursora e sua chaperona são ligadas ao complexo TOM, mais especificamente no receptor Tom70, e, então, transferidas para o canal Tom40 e translocadas através da membrana externa na conformação de α -hélice. Pequenas chaperonas do IMS interagem com as proteínas em trânsito, direcionando-as à membrana interna, mais especificamente, na translocase Tim22. O potencial de membrana ativa o canal Tim22 e as proteínas são liberadas lateralmente na membrana interna (BOHNERT; PFANNER; VAN DER LAAN, 2015; PRIESNITZ; PFANNER; BECKER, 2020; SCHMIDT; PFANNER; MEISINGER, 2010; WIEDEMANN; PFANNER, 2017).

1.3.6 Mecanismo barril- β

O Mecanismo barril- β é responsável pela importação de um pequeno conjunto de proteínas barril- β destinadas à membrana externa da mitocôndria, incluindo as porinas, a subunidade Tom40 (do complexo TOM) e a subunidade Sam50, a qual faz parte da Maquinaria de Direcionamento e Montagem (SAM - *sorting and assembly machinery*) (mecanismo 5, figura 4). As pré-proteínas são sintetizadas nos ribossomos citosólicos, assim como toda proteína de membrana externa. A importação destas proteínas tem início no complexo TOM, seguido de uma ligação com pequenas chaperonas TIM do IMS e então inseridas na membrana externa através do complexo SAM. O dobramento das pré-proteínas é mediado pelas subunidades Sam50 e Sam35 e as proteínas são liberadas na forma de barril- β na região lipídica da membrana externa (BOHNERT; PFANNER; VAN DER LAAN, 2015; CHACINSKA et al., 2009; WIEDEMANN; PFANNER, 2017).

1.3.7 Complexo de importação mitocondrial

O Complexo de Importação Mitocondrial (MIM - *Mitochondrial Import Complex*) (mecanismo 6, figura 4) funciona como uma proteína insertase no processo de biogênese de proteínas da membrana externa que possuem domínios transmembrana de α -hélice. Mais de 90% das proteínas integrais da membrana externa possuem segmentos de α -hélice, as quais podem ser agrupadas em três categorias: 1) proteínas ancoradas por um sinal N-terminal, 2) proteínas ancoradas pela cauda e 3) proteínas ancoradas por meio de vários segmentos. Curiosamente, o complexo MIM parece atuar na biogênese de proteínas apenas das categorias 1 e 3. Especificamente no caso das proteínas que possuem vários segmentos, a inserção das mesmas na membrana parece requerer a participação do receptor Tom70 (BUSCH et al., 2023). Por outro lado, proteínas que possuem um único segmento N-terminal são transportadas independentemente do receptor Tom70 pelo complexo MIM (BECKER et al., 2011). Além disso, uma terceira população de complexos MIM parece interagir com os complexos TOM e SAM durante a biogênese das pequenas proteínas Tom. Portanto, o complexo MIM é uma insertase altamente versátil que promove a biogênese de diferentes proteínas α -helicoidais da membrana externa (DOAN et al., 2020).

1.4 OXIDANTES

EROs é um termo utilizado para várias moléculas, o que muitas vezes causa mal entendidos. Não obstante, o termo “oxidante” também é amplo, mas é evidente o fato de que seu significado engloba diversos tipos de espécies químicas (MURPHY et al., 2011) podendo ser radicalares ou não radicalares. Um exemplo de radical é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e de não radical, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SIES et al., 2022). Estes dois oxidantes se destacam devido a sua constante produção e maior concentração dentro das células (SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017; SIES; JONES, 2020).

Algumas das principais fontes celulares de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 estão localizadas na mitocôndria, no peroxissomo e no retículo endoplasmático (MILLARE; O'ROURKE; TRAYANOVA, 2020; MURPHY, 2009; ROSCOE; SEVIER, 2020; WALKER et al., 2018). Mesmo apresentando baixas concentrações e com baixa reatividade química, o $O_2^{\cdot-}$ danifica indiretamente numerosos componentes celulares. Por outro lado, o H_2O_2 pode, em baixas doses, atuar em vias de sinalização celular, oxidando grupos

tióis (-SH) em proteínas alvos de forma reversível ou irreversível. Porém, em altas doses, pode induzir modificações oxidativas em macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, gerando espécies reativas com consequências potencialmente tóxicas (NETTO; ANTUNES, 2016).

É importante destacar que, além de seus efeitos potencialmente tóxicos, algumas EROs podem também atuar como moléculas sinalizadoras, integrando a função mitocondrial com a do restante da célula. A sinalização redox pode ocorrer por meio das mitocôndrias liberando H_2O_2 , o qual modula a atividade de proteínas alvo, por exemplo através da oxidação reversível de grupos tióis específicos, alterando assim a atividade de enzimas, quinases, fosfatases e fatores de transcrição na mitocôndria, no citosol ou no núcleo (NETTO; ANTUNES, 2016).

1.4.1 Superóxido

O $O_2^{\cdot-}$ desempenha um papel importante em processos químicos no contexto biológico. Ele pode ser gerado em diversas reações enzimáticas e não enzimáticas dentro da célula, como por exemplo, resultado da redução monoelétrica do oxigênio molecular (O_2). Uma das principais fontes de $O_2^{\cdot-}$ é o vazamento de elétrons na cadeia respiratória da membrana interna da mitocôndria (Figura 5) (SIES et al., 2022).

Embora o $O_2^{\cdot-}$ em si não seja altamente reativo, ele pode causar danos indiretos às células. Essa espécie reativa contribui para a produção do radical hidroxila (HO^{\cdot}), um radical extremamente reativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), através de sua participação na Reação de Fenton. Nessa reação, o $O_2^{\cdot-}$ reduz íons de ferro (Fe^{3+}) para íons ferrosos (Fe^{2+}), como ilustrado na Figura 5. Em ambientes aquosos, a reação predominante do $O_2^{\cdot-}$ é a dismutação, na qual este radical se transforma em uma molécula de H_2O_2 e uma molécula de O_2 . O $O_2^{\cdot-}$ também pode reagir rapidamente com outros radicais, como o óxido nítrico (NO^{\cdot}), dando origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O $O_2^{\cdot-}$ é capaz de reagir eficientemente com os clusters de ferro-enxofre (Fe-S), que são cofatores presentes em várias proteínas da cadeia respiratória mitocondrial e na enzima aconitase do ciclo de Krebs. Esses clusters de Fe-S atuam como grupos prostéticos essenciais para a atividade dessas proteínas. Portanto, quando o $O_2^{\cdot-}$ reage com esses clusters, o ferro pode ser liberado, comprometendo a atividade mitocondrial (BENOV, 2001; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; SIES, 2017;). Esses danos nas proteínas mitocondriais podem levar a disfunções

metabólicas e ao estresse oxidativo nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SIES, 2017; SIES et al., 2022).

Portanto, embora o $O_2^{\cdot-}$ seja uma espécie reativa crucial para vários processos biológicos, sua acumulação excessiva ou desregulada pode ser prejudicial para a célula. O equilíbrio entre a produção e o controle dessas espécies reativas é fundamental para a manutenção da saúde celular. Mecanismos de defesa antioxidante, como enzimas antioxidantes e moléculas redutoras, estão envolvidos na neutralização e remoção do $O_2^{\cdot-}$ e de outras espécies reativas, ajudando a preservar a integridade e a função das células. O estudo desses processos é essencial para compreender o papel do $O_2^{\cdot-}$ na fisiologia celular e as implicações para a saúde e doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

1.4.2 Peróxido de Hidrogênio

Como mencionado anteriormente, o H_2O_2 pode ser gerado a partir da reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$. Dismutação é um tipo de reação química na qual duas moléculas da mesma espécie reagem entre si em uma reação de óxido-redução. Ou seja, no caso do $O_2^{\cdot-}$, uma molécula é oxidada para O_2 e outra reduzida para formar o H_2O_2 , conforme reação 1.



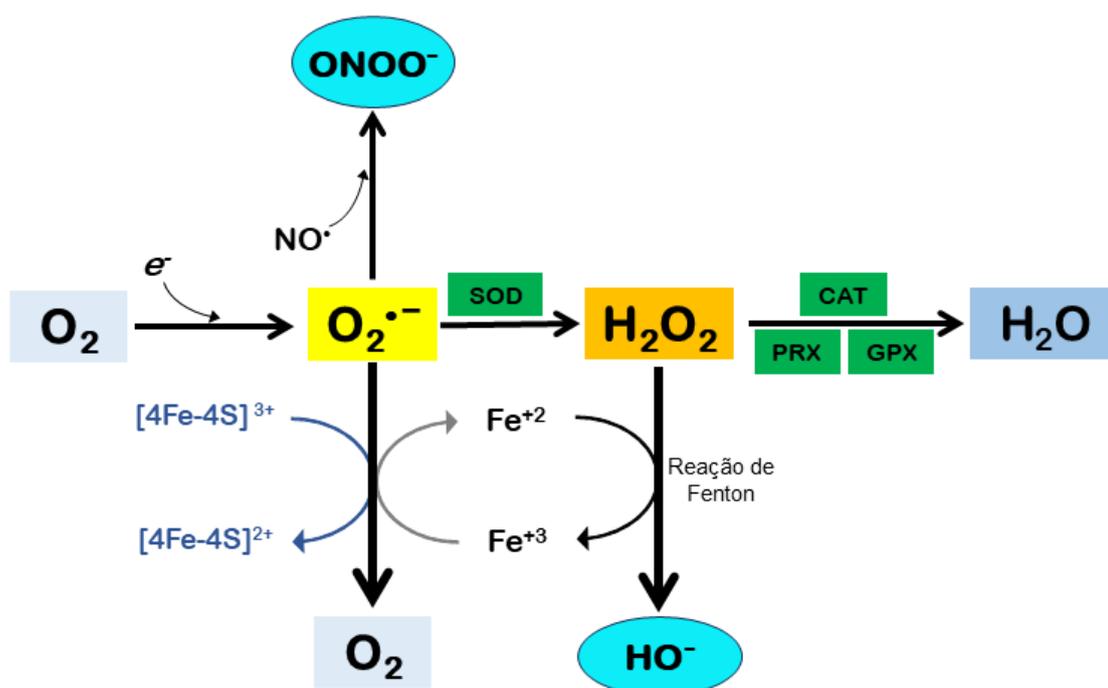
A reação de dismutação pode ocorrer de maneira espontânea, apresentando uma constante de reação de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Contudo, esta reação ao ser catalisada pela SOD aumenta sua velocidade da reação para, aproximadamente, $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou seja, 10^4 vezes mais rápida (FRIDOVICH, 1975; WANG et al., 2018). Em condições fisiológicas, a dismutação, ocorre com maior velocidade em pH ácido, o que facilita a protonação do $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O H_2O_2 mitocondrial se difunde lentamente através da MIM. Porém, pode atravessar facilmente a membrana mitocondrial externa, devido a presença de porinas, e alcançar o citosol. Em contrapartida à sua difusão, o H_2O_2 pode ser eficientemente reduzido a água por diferentes peroxidases, incluindo peroxirredoxinas (Prxs), glutathiona peroxidases (Gpxs) e catalases (HOEHNE et al., 2022). Per se, o H_2O_2 não é uma molécula altamente tóxica, contudo, participa da Reação de Fenton (HENRY JOHN FENTON, 1894), a qual produz o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (HABER;

WEISS, 1934), que é implicado em danos às moléculas biológicas (FISCHBACHER; SONNTAG; SCHMIDT, 2017; ILLÉS et al., 2020; WINTERBOURN, 1995).

O H_2O_2 reage lentamente com resíduos de cisteínas (Cys) da maioria das proteínas, incluindo fatores de transcrição e fosfatases (NETTO; ANTUNES, 2016). No entanto, algumas enzimas, em especial as peroxirredoxinas, possuem extraordinária reatividade frente ao H_2O_2 em decorrência de seus resíduos de cisteínas estarem localizados no contexto de sítios ativos especializados na redução de peróxidos (RHEE; WOO, 2011).

Figura 5. Formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de WANG et al., 2018.

Representação esquemática das reações de formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . O $\text{O}_2^{\cdot-}$ é formado a partir da redução monoelétrica do O_2 e, uma vez formado, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode reagir com NO^\cdot , dando origem ao ONOO^- , um oxidante não radicalar. A partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$, ocorre também a formação espontânea de H_2O_2 , chamada dismutação. No entanto, na presença da enzima SOD, a dismutação é acelerada, aumentando em 10^4 vezes a sua velocidade. O H_2O_2 formado, por sua vez, é reduzido por enzimas (Cat, Prx, Gpx), formando água. Além disso, o H_2O_2 reage com Fe^{2+} , através da Reação de Fenton, liberando Fe^{3+} e formando HO^\cdot , um dos oxidantes mais reativos. A redução do Fe^{3+} pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ permite que a reação continue e enzimas que possuem clusters de Fe-S perdem sua atividade quando o $\text{O}_2^{\cdot-}$ reduz o Fe^{3+} para Fe^{2+} do cluster, liberando Fe^{2+} para a Reação de Fenton (adaptado de WANG et al., 2018).

Atualmente, existe um número crescente de evidências demonstrando que o H_2O_2 atua como um agente sinalizador redox em processos biológicos essenciais para a fisiologia da célula. Existem basicamente dois modelos que tentam explicar o mecanismo pelo qual o H_2O_2 atua como uma molécula sinalizadora. O primeiro deles, conhecido como *redox relay*, propõe que o H_2O_2 reage inicialmente com as Prxs, induzindo a oxidação de seus resíduos de Cys, formando o ácido sulfênico seguido de um dissulfeto. Em seguida, as Prxs poderiam transferir esses equivalentes redox para uma proteína alvo envolvida na sinalização (comentados a seguir). O segundo modelo, conhecido como *floodgate*, propõe que altos níveis de H_2O_2 poderiam induzir a superoxidação das Prxs, levando ao acúmulo local desse peróxido em locais específicos da célula que poderia então oxidar um proteína sinalizadora (RHEE et al., 2012).

1.5 PEROXIRREDOXINAS (Prxs)

As Prxs são enzimas ubíquas e abundantes que estão envolvidas em múltiplos processos celulares, incluindo a defesa antioxidante (RHEE et al., 2001). Estas proteínas não contêm grupos prostéticos e sua atividade está baseada em resíduos de cisteínas altamente reativos para peróxidos. Ainda, são um grupo de peroxidases dependentes de tióis que catalisam a redução de diferentes tipos de peróxidos, incluindo H_2O_2 , hidroperóxidos de alquila e peroxinitrito (RHEE, 2016).

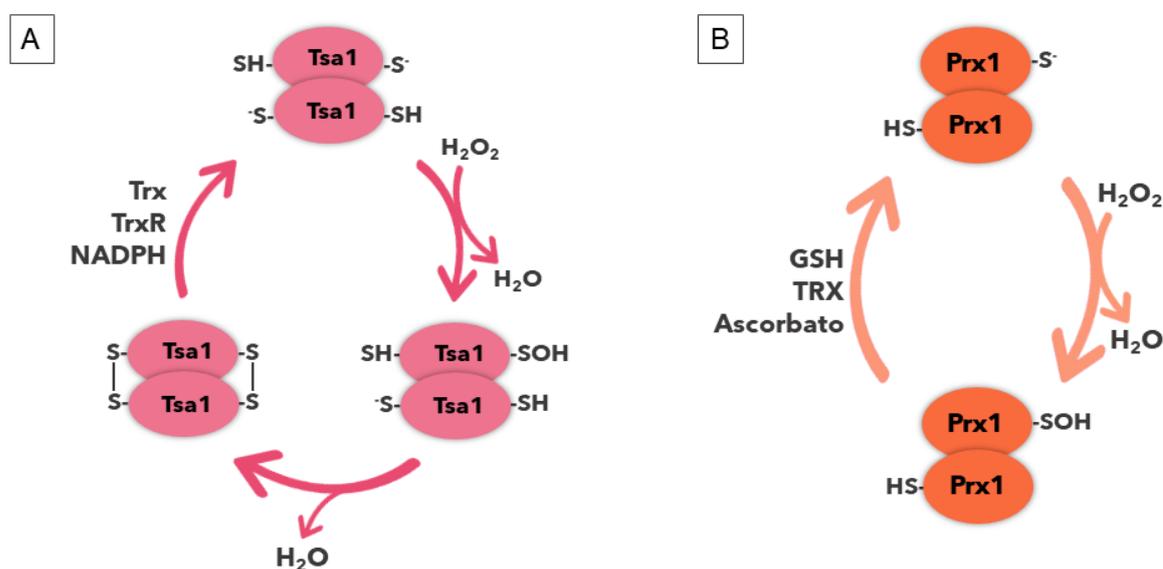
Todas as enzimas Prx contêm um resíduo de Cys conservado, chamado Cys peroxidásica (C_P), localizada na região N-terminal da enzima, onde ocorre a oxidação por peróxidos. O ciclo catalítico das Prxs inicia-se com o ataque nucleofílico do tiolato da C_P à molécula de H_2O_2 , liberando água, enquanto que a C_P se torna oxidada para a forma de ácido sulfênico (C_P -SOH) (figura 6). O ácido sulfênico gerado é posteriormente reduzido e o mecanismo pelo qual isso ocorre diferencia as Prxs em dois grupos, as 2-Cys e as 1-Cys. (NETTO et al., 2007; WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003).

No grupo das 2-Cys-Prxs (figura 6A), um segundo resíduo de cisteína, denominado cisteína de resolução (C_R), reage com o ácido sulfênico (-SOH) da C_P liberando uma molécula de água e originando uma ligação dissulfeto entre os dois resíduos de cisteína (CHAE; CHUNG; RHEE, 1994; CHAE; UHM; RHEE, 1994; HALL et al., 2011; NETTO et al., 2007). A formação do dissulfeto durante a oxidação é o diferencial entre as 2-Cys-Prx típica e atípica. Enquanto que a proteína típica faz uma

ligação intermolecular, a 2-Cys atípica estabelece uma ligação dissulfeto intramolecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; RHEE, 2016). O dissulfeto formado entre os resíduos de C_P e C_R é posteriormente reduzido, na maior parte dos casos, por uma segunda enzima, a Tiorredoxina (Trx) (RHEE et al., 2012).

Já no grupo das 1-Cys-Prxs, a enzima não apresenta a C_R , e a C_P -SOH formada é reduzida diretamente por um agente externo à peroxidase (figura 6B). O redutor biológico de algumas Prxs do grupo das 1-Cys permanece em debate. Algumas possibilidades são a formação de um dissulfeto misto com um resíduo de cisteína oriundo de outras proteínas ou com tióis de baixo peso molecular (GREETHAM; GRANT, 2009; PEDRAJAS et al., 2010a). Nosso grupo mostrou que ascorbato pode reduzir C_P -SOH de 1-Cys Prxs (ANSCHAU et al., 2020; MONTEIRO et al., 2007) sendo necessário ainda demonstrar a relevância biológica dessa redução.

Figura 6. Ciclo catalítico das Prxs



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de (RHEE; KIL, 2017)

A) No ciclo catalítico da proteína 2-Cys Prx, aqui representado pela Tsa1 de *S. cerevisiae*, a C_P reduz o H_2O_2 liberando água, e torna-se oxidada na forma de ácido sulfênico (-SOH). O resíduo de C_R de um outro monômero de Tsa1 reage com a Cys oxidada formando uma ligação dissulfeto intermolecular entre os dois monômeros. Em seguida, a enzima tiorredoxina (representado pela Trx1) catalisa a redução da ligação dissulfeto. B) O ciclo catalítico da enzima Prx1 inicia quando o resíduo de cisteína peroxidásica ataca o H_2O_2 liberando água e consequente conversão do grupo tiol da enzima para ácido sulfênico. Dada a ausência de uma C_R , a C_P forma um dissulfeto com o grupo tiol fornecido por outras proteínas ou moléculas de baixo peso molecular, como a tiorredoxina (Trx3), a glutathiona e o ascorbato.

1.6 PRX1, UMA 1-CYS PRX MITOCONDRIAL DE *S. cerevisiae*

A Prx1 da levedura *S. cerevisiae* foi descrita, inicialmente, por PEDRAJAS et al., 2000. A proteína Prx1 é codificada por um gene nuclear e sintetizada no citoplasma na forma de uma proteína precursora mitocondrial. Os primeiros 38 aminoácidos da região N-terminal compõem a pré-sequência de endereçamento mitocondrial (figura 7) que é removida por proteases mitocondriais. Desse modo, as cisteínas C6 e C38 não fazem parte da proteína madura direcionada para a matriz (GOMES et al., 2017; VÖGTLE et al., 2009). Neste sentido, o resíduo C91 consiste na C_P.

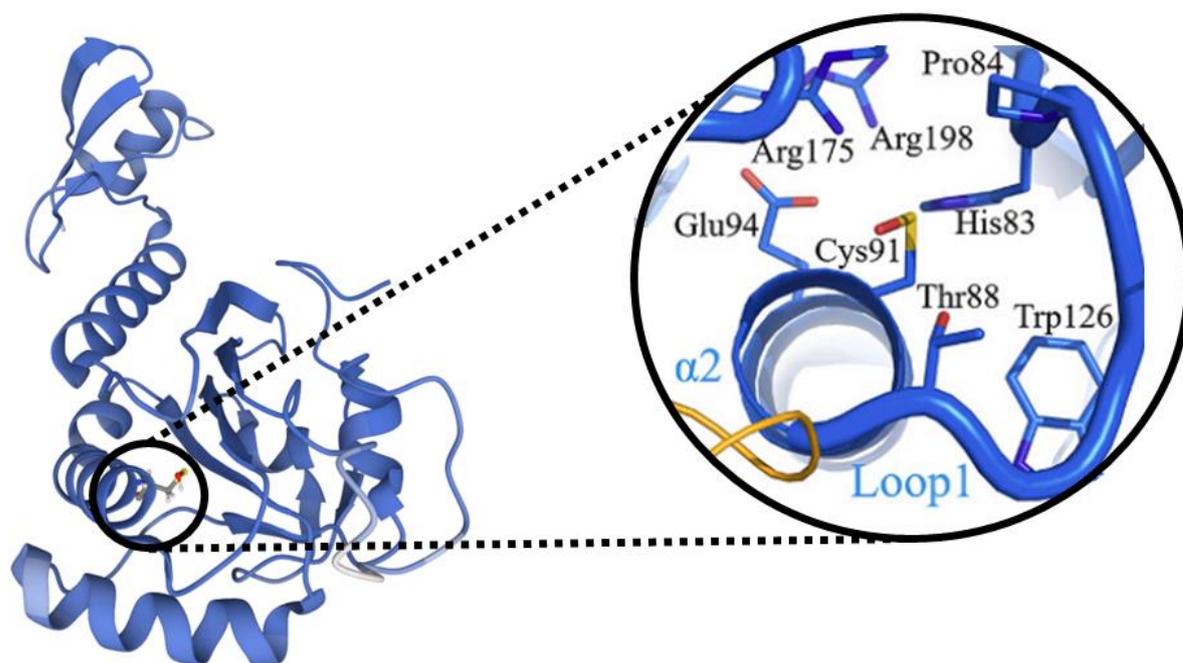
A estrutura de Prx1, foi descrita recentemente (Li et al., 2020). Neste estudo, os resíduos iniciais 1-48 da região N-terminal da proteína foram removidos, com o intuito de beneficiar a cristalização. Cabe destacar que os primeiros 38 resíduos são clivados por proteases durante a importação de Prx1 para a mitocôndria (GOMES et al., 2017). Li e colaboradores (Li et al., 2020) levantaram a hipótese de que os resíduos His83, Pro84, Thr88 e Trp126, que estão localizados no entorno da C91 (figura 7), podem contribuir para a função proteica, sendo que uma histidina homóloga a His83 em Prx de *Plasmodium falciparum* parece desempenhar função catalítica (FELD et al., 2019).

Como comentado anteriormente, a Prx1 de levedura é pertencente ao grupo das 1-Cys Prxs. Desse modo, uma segunda proteína ou até mesmo uma molécula de baixo peso molecular é quem reage diretamente com C_P-SOH (NETTO et al., 2007). Trx3, Glutathione (GSH) e o Ascorbato foram propostos como possíveis redutores de C_P-SOH (GREETHAM et al., 2013; GREETHAM; GRANT, 2009; MONTEIRO et al., 2007; PEDRAJAS et al., 2000, 2010a, 2016).

As Prxs foram descritas como enzimas dependentes de tióis como agentes redutores. Este paradigma foi desafiado por um estudo do nosso grupo, no qual demonstrou-se que um composto não tiólico, o ascorbato, pode sustentar a atividade peroxidásica de Prx1 (MONTEIRO et al., 2007). O ascorbato, também conhecido como vitamina C, não é sintetizado pelas células humanas, mas adquirido na dieta. Assim como os mamíferos, a levedura *S. cerevisiae* também não sintetiza o ascorbato, contudo, essas células sintetizam um análogo deste composto, o eritroascorbato. A partir disso, Monteiro et al. (MONTEIRO et al., 2007) propuseram caracterizar a função redutora do ascorbato para a Prx1. Inicialmente, observaram a capacidade, dependente da dose, do ascorbato de doar elétrons. E mesmo testando outros redutores tiólicos, como a glutathione, mercaptoetanol, DTT, e não tiólicos, como trolox

e ureato, apenas os tióis e ascorbato suportaram a atividade de Prx1. Ainda, mostraram que o ascorbato possui atividade antioxidante que até então não havia sido caracterizada. Recentemente, nosso grupo determinou as constantes cinéticas das reduções de ácidos sulfênicos em 1-Cys Prxs por ascorbato como sendo na ordem de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ANSCHAU et al., 2020).

Figura 7. Estrutura geral da proteína N48ScPrx1



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de LI et al., 2020.

A cristalização da proteína N48ScPrx1 foi obtida pelo método de difusão de vapor em gota suspensa, e os cristais otimizados foram obtidos utilizando PEG-2000 MME 23%, Tris base 100 mM/HCl em pH 4.7, na concentração de 27,3 mg/mL. Os dados de difração foram coletados com uma câmera CCD e obtidos os cristais de N48ScPrx1 que difratam para resolução de 1,53 Å. A representação gráfica da Prx1 foi produzida no software PyMOL e depositada no banco de estruturas de proteínas *Protein Data Bank* sob o código pdb 5YKJ. No detalhe é possível observar o resíduo C91.

Alternativamente, a glutationa (GSH) pode estar envolvida na redução de Prx1, estando presente no citosol e na mitocôndria. GSH apresenta múltiplos papéis nas células além da redução de Prx1. Por exemplo, GSH pode ser oxidada diretamente pelo H_2O_2 , embora essa reação seja lenta (WINTERBOURN; METODIEWA, 1999). O *pool* de GSH no citosol é menos sensível à oxidação induzida por H_2O_2 do que o *pool* desse tiól na mitocôndria, sendo que a oxidação de GSH por H_2O_2 na mitocôndria é

dependente de Prx1 (CALABRESE et al., 2019). De fato, GSH não foi oxidada por H_2O_2 em leveduras com deleção do gene para a Prx1. Além disso, a deficiência de Prx1 desencadeia uma resposta compensatória em resposta ao acúmulo de H_2O_2 mitocondrial, ativando a regulação da catalase citosólica (Ctt1) (CALABRESE et al., 2019). Neste contexto, a hiperoxidação da Prx1, também previne a oxidação da GSH pelo H_2O_2 , influenciando na viabilidade celular sob o estresse deste composto. A glutatona pode formar um dissulfeto misto com Prx1 e pode ser, então, reduzida pela Trx3 (PEDRAJAS et al., 2016).

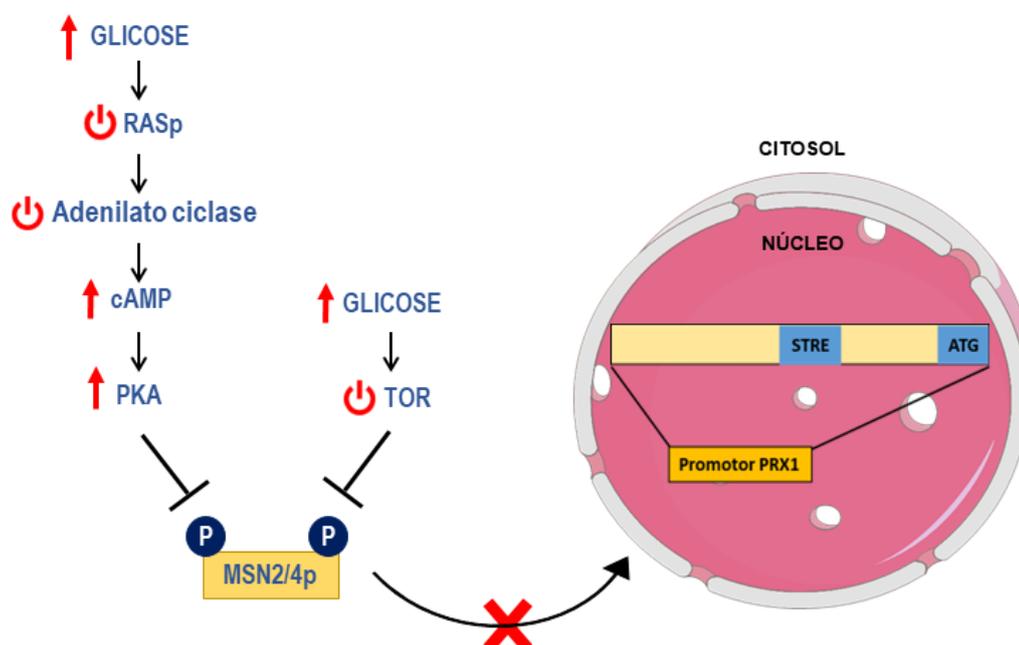
1.6.1 Expressão dos genes de Prx1

A expressão de Prx1 é fortemente induzida em condições respiratórias e em resposta a condições de estresse oxidativo, indicando um importante papel dessa 1-Cys-Prx na proteção contra o estresse oxidativo (MONTEIRO et al., 2002; MONTEIRO; NETTO, 2004; PEDRAJAS et al., 2000)

As leveduras preferencialmente utilizam glicose e frutose como fontes de carbono mesmo na presença de outras, como glicerol e etanol. As enzimas responsáveis pelo metabolismo das fontes de carbono como glicerol e etanol são significativamente reprimidas quando a glicose está presente no meio de cultura. (HEDBACKER; CARLSON, 2008; KAYIKCI; NIELSEN, 2015; SANZ; VIANA; GARCIA-GIMENO, 2016). Este fenômeno, conhecido como repressão catabólica, se dá a nível transcricional e afeta também diversas outras proteínas como por exemplo, a Catalase (CTT) e Ubiquitina (UBI4), interferindo no metabolismo e na velocidade do crescimento celular. Monteiro et. al. em 2004, demonstraram que o gene da Prx1 (ORF *YBL064c*) é preferencialmente expresso em meio respiratório, como glicerol/etanol, e em meios com glicose (fermentativo) há menor expressão. Este fenômeno condiz com a função antioxidante de Prx1, já que a produção de EROs é maior em meio respiratório (MONTEIRO; NETTO, 2004).

Altas concentrações de glicose no meio causam uma acidificação do citosol, o que resulta na ativação das proteínas Ras (RASp). As RASp são responsáveis pela ativação da adenilato ciclase que, conseqüentemente, catalisa a hidrólise de ATP em cAMP, aumentando os níveis deste composto. Por outro lado, os níveis intracelulares de cAMP são diminuídos durante o consumo de glicose para, então, a levedura crescer em meio com etanol.

Figura 8. Modelo esquemático do envolvimento de TOR quinase e PKA na regulação da expressão de Prx1 da levedura *S. cerevisiae*



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de MONTEIRO; NETTO, 2004

Em resposta aos níveis de nutrientes, a regulação da expressão de Prx1 é mediada via TOR quinase e PKA. Em condições de elevada disponibilidade de nutrientes, a translocação do fator de transcrição Msn2/4 para o núcleo é inibida através da fosforilação promovida pelas proteínas TOR e PKA. STRE representa o sítio de ligação do DNA do fator de transcrição Msn2/4, presente na região promotora do gene *PRX1*. Símbolos: ⏻ Ativação ↑ Altos níveis ✗ Impedimento ⊥ inibição

Nessa mudança ocorre a reprogramação gênica para a adaptação da levedura a uma nova condição de crescimento, chamada diauxia. Após a diauxia, as células passam a ser controladas pela via principal de repressão por glicose e a via Ras-cAMP é desativada. Mantendo-se artificialmente altos os níveis de cAMP e baixos níveis de glicose, foi observado um efeito repressor na expressão de Prx1, sugerindo a participação de cAMP como segundo mensageiro na via de repressão por glicose (MONTEIRO; NETTO, 2004) (figura 8).

Após os níveis de cAMP se elevarem, a atividade da Proteína Quinase Dependente de cAMP (PKA) é induzida. A PKA de *S. cerevisiae* atua na coordenação de vários eventos celulares essenciais, e é um regulador negativo dos fatores de transcrição Msn2p e Msn4p. A concentração dos fatores de transcrição Msn2/4p no núcleo é dependente de sinais de estresse, choque osmótico, danos oxidativos e mudanças de temperatura (LUSHCHAK, 2010; MORANO; GRANT; MOYE-ROWLEY,

2012). Portanto, a PKA, quando ativada, fosforila os fatores de transcrição Msn2/4p, impedindo sua translocação para o núcleo e mantendo-os no citosol. Uma vez no citosol, estes fatores de transcrição se ligam à proteína adaptadora Bmh2, formando um complexo estável.

Os fatores de transcrição Msn2p e Msn4p não são apenas regulados pela via Ras-cAMP-PKA, mas também pela proteína TOR quinase (figura 8). O complexo TOR regula a localização celular de Tpk1p, a subunidade catalítica da PKA, de maneira semelhante ao aumento de cAMP (CREAMER et al., 2022; PLANK, 2022).

1.6.2 Localização da Prx1

A mitocôndria de levedura possui aproximadamente 1.000 proteínas distribuídas e nos quatro subcompartimentos mitocondriais. Através de uma análise integrada combinando subfracionamento mitocondrial, Isótopo Estável Marcado Usando Aminoácidos em Culturas (SILAC - *Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) e espectrometria de massas quantitativa, Vögtle e colaboradores em 2017 determinaram a localização de grande parte das proteínas mitocondriais da levedura *S. cerevisiae* (VÖGTLE et al., 2017). No total, o estudo determinou a localização suborganelar de 818 proteínas nos quatro subcompartimentos mitocondriais além de 206 proteínas que ainda não haviam sido designadas para a mitocôndria. Nesse estudo, a Prx1 foi localizada na matriz mitocondrial.

Adicionalmente, estudos realizados em nosso grupo demonstraram que Prx1 possui dupla localização mitocondrial, sendo encontrada na matriz e no IMS (GOMES et al., 2017). Com experimentos de subfracionamento mitocondrial, os autores demonstraram a colocalização das proteínas Prx1, TrxR e Trr2 na matriz mitocondrial. As três proteínas são encontradas aderidas na membrana interna da mitocôndria com a face hidrofílica voltada para a matriz. Esta colocalização sugere que há uma interação *in vivo* entre estas enzimas durante a redução do H₂O₂.

O mecanismo pelo qual a pré-proteína é levada ao IMS permanece a ser elucidado, mas sabe-se que envolve o complexo IMP, que fazem parte as proteínas Imp1-2 e Som1 (GOMES et al., 2017). Há evidências de que Prx1 poderia ser direcionada para o IMS através do mecanismo parada da transferência (EDWARDS; GERLICH; TOKATLIDIS, 2020). Proteínas que utilizam esse mecanismo de importação possuem um segmento hidrofóbico localizado após a pré-sequência (GLICK et al., 1992; VAN LOON; SCHATZ, 1987). Durante a translocação através de

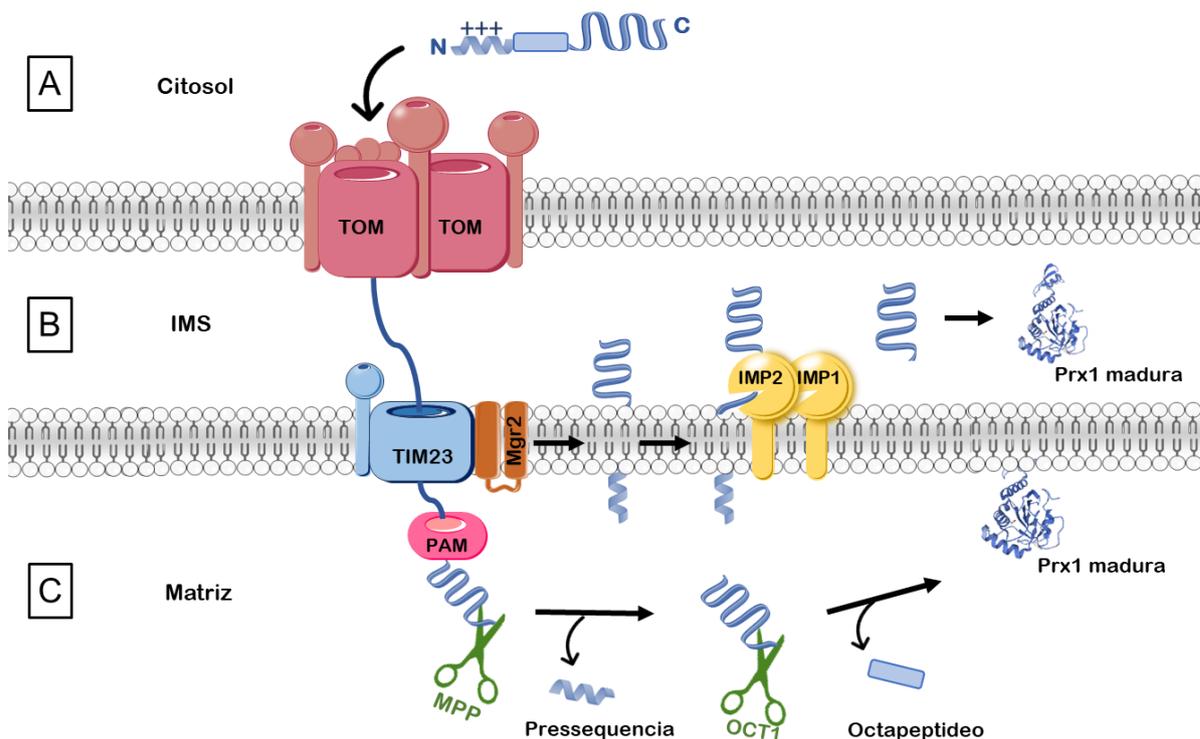
TIM23, o segmento hidrofóbico bloqueia esse processo e induz a liberação da proteína precursora no interior da bicamada lipídica da membrana interna (IEVA et al., 2014) (figura 9B).

Após serem liberadas na membrana externa da mitocôndria, as proteínas destinadas ao espaço intermembrana (IMS) passam por um processo de clivagem pelo complexo IMP, que é responsável por liberá-las no IMS (CHACINSKA et al., 2009). Estudos realizados por Gomes et al. mostraram que a enzima Prx1, uma peroxirredoxina, não é encontrada no IMS em uma linhagem mutante para o gene da protease Imp2. A protease Imp2 faz parte do complexo IMP e está localizada na membrana interna da mitocôndria. Ela reconhece e cliva os segmentos hidrofóbicos das pré-proteínas, liberando-as no IMS. Portanto, sugere-se que a Prx1 seja translocada para a membrana interna e, após a clivagem pelo complexo IMP, seja liberada no IMS, adquirindo sua forma madura a partir do resíduo de Ala32.

Existem evidências de que a Prx1 direcionada ao IMS seja menos abundante do que sua forma presente na matriz mitocondrial. Isso pode ser explicado pelo fato de que o sinal hidrofóbico responsável por interromper a translocação da pré-proteína pelo complexo Tim23 é de tamanho reduzido, o que favorece o direcionamento da pré-proteína para a matriz. Além disso, o possível segmento hidrofóbico da Prx1 contém um resíduo de prolina, que tem sido demonstrado interferir na liberação das pré-proteínas na bicamada lipídica da membrana interna (MEIER; NEUPERT; HERRMANN, 2005).

A importação da Prx1 para a matriz mitocondrial ocorre por meio do mecanismo de importação por pré-sequência (Figura 9C). Após entrar na matriz, a pré-sequência da Prx1 é clivada inicialmente pela protease de Peptidase de Processamento Mitocondrial (MPP - *Mitochondrial Processing Peptidase*) e posteriormente pela protease Oct1 (GOMES et al., 2017; VÖGTLE et al., 2011). A protease Oct1 remove mais oito aminoácidos após a clivagem da MPP. Dessa forma, a forma madura da proteína na matriz inicia-se no resíduo de Lys39 e, portanto, não possui o resíduo Cys38. No entanto, é possível que esse resíduo esteja envolvido na regulação da importação da Prx1 para a mitocôndria, possivelmente mantendo a pré-proteína na forma reduzida.

Figura 9. Mecanismo de importação mitocondrial da proteína Prx1 em *S. cerevisiae*



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de GOMES et al., 2017.

A) A pré-proteína Prx1 é direcionada ao complexo TOM para iniciar sua translocação através deste complexo. B) Após atravessar o complexo TOM, a pré-proteína inicia a passagem através do complexo TIM. Estes, juntamente com a Mgr2, identificam a pré-proteína por meio da pré-sequência bipartida e a liberam lenta e lateralmente para a região hidrofóbica da membrana interna e sua pré-sequência e o octapeptídeo são clivados pelo complexo IMP (Imp1/2) e a proteína madura é liberada no IMS. C) A Prx1 quando destinada à matriz é transportada passando pelo complexo TIM e após alcançar a matriz com auxílio do complexo PAM, a pré-sequência é clivada pela MPP, e em seguida a Oct1 retira os oito aminoácidos da estrutura, e então a proteína adquire sua estrutura madura.

É importante destacar que o volume do IMS é menor do que o da matriz mitocondrial. Portanto, é possível que haja uma maior quantidade de moléculas de Prx1 na matriz, mas as concentrações das duas formas (IMS e matriz) possam ser semelhantes. A distribuição diferencial das formas da Prx1 entre o IMS e a matriz sugere que essas localizações distintas desempenham papéis específicos na função da enzima e na regulação do estresse oxidativo nas mitocôndrias. A compreensão desses mecanismos de importação e distribuição de proteínas no interior da mitocôndria é crucial para entender as vias metabólicas e os processos celulares relacionados à função mitocondrial.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi compreender as funções da proteína 1-Cys-Prx1 localizada na matriz e no IMS de mitocôndrias de *S. cerevisiae*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir linhagens de levedura *S. cerevisiae* com o objetivo de caracterizar o papel biológico da proteína Prx1 em cada subcompartimento mitocondrial. Uma que apresenta a Prx1 somente na matriz (M-Prx1) e outra no IMS (IMS-Prx1);
- Avaliar os papéis da Prx1 em resposta ao estresse oxidativo, para entender a relevância da presença da proteína em cada subcompartimento mitocondrial, comparando-a com linhagens do tipo selvagem e com deleção para o gene da Prx1 (Δ Prx1).
- Analisar a importação *in vitro* da Prx1 para a mitocôndria de levedura *S. cerevisiae* do tipo selvagem e mutantes, sob condições normais e de estresse oxidativo.

6. CONCLUSÕES

- As células de levedura apresentaram uma maior resistência aos agentes oxidativos quando cultivadas em meio contendo glicose, em comparação com o meio contendo glicerol/etanol;
- As linhagens IMS-Prx1 e Δ Prx1 apresentaram uma sensibilidade significativamente maior ao H_2O_2 em comparação com as células não tratadas e quando comparadas à linhagem WT e à M-Prx1;
- As linhagens IMS-Prx1 e Δ Prx1 mostraram uma maior sensibilidade ao H_2O_2 em comparação com a *t*-BHP;
- A Prx1p presente na matriz mitocondrial, como nas linhagens WT e M-Prx1, os fenótipos são semelhantes, independentemente da presença ou ausência da Prx1p no IMS.

7. REFERÊNCIAS

ANSCHAU, V. et al. Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 156, p. 207–216, 2020.

ARAISSO, Y. et al. Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. **Nature**, v. 575, n. 7782, p. 395–401, 2019.

ARAISSO, Y.; ENDO, T. Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex. **Biophysics and physicobiology**, 2022.

BACKES, S.; HERRMANN, J. M. Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: Mechanisms and driving forces. **Frontiers in Molecular Biosciences**, p. 1–11, 2017.

BANCI, L. et al. A Structural-Dynamical Characterization of Human Cox17. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, mar. 2008.

BANCI, L. et al. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 2, 1 fev. 2009.

BAUSEWEIN, T. et al. The structure of the TOM core complex in the mitochondrial outer membrane. **Biological Chemistry**, 2011.

BECKER, T. et al. The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. **Journal of Cell Biology**, 194(3) 387-395, 2011.

BECKER, T.; SONG, J.; PFANNER, N. Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. **Trends in Cell Biology**, v. 29, n. 7, p. 534–548, 2019.

BENADOR, I. Y. et al. Mitochondria Bound to Lipid Droplets: Where Mitochondrial Dynamics Regulate Lipid Storage and Utilization. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 827–835, 2019.

BENOV, L. How superoxide radical damages the cell. **Protoplasma**. 217(1-3):33-6. 2001

BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 33, p. 92–102, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, 1976.

BREJNING J, JESPERSEN L, ARNEBORG N. Genome-wide transcriptional changes during the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**. 179(4) 278-294. 2003

BURKE, P. J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 12, p. 857–870, 2017.

BUSCH J, et. al. Mitochondrial protein transport: Versatility of translocases and mechanisms. **Molecular Cell**. 83(6) 890-910. 2023.

CADENAS, E; SIES H. The Lag Phase. **Free Radical Research**, 28 601-609. 1998.

CALABRESE, G. et al. Hyperoxidation of mitochondrial peroxiredoxin limits H₂O₂ - induced cell death in yeast. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 18, 16 set. 2019.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 44, 1994.

CHAE, H. Z.; UHM, T. B.; RHEE, S. G. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 15, 1994.

CHANDEL, N. S. Lipid Metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 13, n. 9, 2021.

CHACINSKA A, et. al. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. **Cell**. 138(4) 628-644, 2009.

CHATZI A, MANGANAS P, TOKATLIDIS K. Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease. **BBA - Molecular Cell Research**, 1863(6) 1298-1306, 2016.

COLINA-TENORIO, L. et al. Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 6, p. 645–664, 2020.

COLOMBINI, M. VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256–257, n. 1–2, p. 107–115, 2004.

CORTESE, J. D.; VOGLINO, A. L.; HACKENBROCK, C. R. The ionic strength of the intermembrane space of intact mitochondria is not affected by the pH or volume of the intermembrane space. **BBA - Bioenergetics**, v. 1100, n. 2, 1992.

CRAVEN L, et. al. Recent Advances in Mitochondrial Disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. Aug 31; 18:257-275, 2017.

CREAMER D, et al. Yeast Protein Kinase A Isoforms: A Means of Encoding Specificity in the Response to Diverse Stress Conditions? **Biomolecules**, 12(7), 2022.

D'AUTRÉAUX, B; TOLEDANO, M. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 8(10) 813-824. 2007.

DOAN, K. et. al. The Mitochondrial Import Complex MIM Functions as Main Translocase for α -Helical Outer Membrane Proteins. **Cell Reports**, 31(4) 107567, 2020.

DUPUIS, L. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. **Biochimie**. 100(1) 177-183, 2014.

EDWARDS, R.; EAGLESFIELD, R.; TOKATLIDIS, K. The mitochondrial intermembrane space: The most constricted mitochondrial sub-compartment with the largest variety of protein import pathways. **Open Biology**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2021.

EDWARDS, R.; GERLICH, S.; TOKATLIDIS, K. The biogenesis of mitochondrial intermembrane space proteins. **Biological Chemistry**, 2020.

ELTSCHINGER S, LOEWITH R. TOR Complexes and the Maintenance of Cellular Homeostasis. **Trends in Cell Biology**. 26(2) 148-159, 2016.

ESSER, K. et al. The mitochondrial IMP peptidase of yeast: Functional analysis of domains and identification of Gut2 as a new natural substrate. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, n. 5, 2004.

FELD, K. et al. Tyrosine substitution of a conserved active-site histidine residue activates Plasmodium falciparum peroxiredoxin 6. **Protein Science**, v. 28, n. 1, p. 100–110, 2019.

FISCHBACHER, A.; SONNTAG, C. VON; SCHMIDT, T. C. Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen Peroxide/Fe(II) ratios. **Chemosphere**, 2017.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 7, 2000.

FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 44, p. 147–159, 1975.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, 1995.

GALA M, VÖGTLE N. Mitochondrial proteases in human diseases. **FEBS Letters**, 595(8) 1205-1222, 2021.

GASSER, S. M. et al. Imported mitochondrial proteins cytochrome b2 and cytochrome c1 are processed in two steps. **PNAS**, v. 79, p. 267–271, 1982.

GIETZ, D. R. et al. Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. **Yeast**, v. 11, p. 355–360, 1995.

GLICK, B. S. et al. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. **Cell**, v. 69, n. 5, 1992.

GOLD, V. A. M. et al. Analysis of Mitochondrial Membrane Protein Complexes by Electron Cryo-tomography. **Methods in Molecular Biology**. 1567:315-336. 2017.

GOMES, F. et al. Assessment of Submitochondrial Protein Localization in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **JOVE**, v. 173, n. 173, 19 jul. 2021

GOMES, F. et. al. Dissecting the molecular mechanisms of mitochondrial import and maturation of peroxiredoxins from yeast and mammalian cells. **Biophysical Reviews**, 13(6), 983–994, 2021.

GOMES, F. et al. Proteolytic cleavage by the inner membrane peptidase (IMP) complex or Oct1 peptidase controls the localization of the yeast peroxiredoxin Prx1 to distinct mitochondrial compartments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 41, p. 17011–17024, 2017.

GREETHAM, D. et al. Oxidation of the yeast mitochondrial thioredoxin promotes cell death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 4, p. 376–385, 2013.

GREETHAM, D.; GRANT, C. M. Antioxidant Activity of the Yeast Mitochondrial One-Cys Peroxiredoxin Is Dependent on Thioredoxin Reductase and Glutathione In Vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 11, p. 3229–3240, jun. 2009.

GREVEL, A.; BECKER, T. Porins as helpers in mitochondrial protein translocation. **Biological Chemistry**, v. 401, n. 6–7, p. 699–708, 26 maio 2020.

GUDA P, GUDA C, SUBRAMANIAM, S. Reconstruction of Pathways Associated with Amino Acid Metabolism in Human Mitochondria. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, 5(3-4) 166-176. 2007.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences**, v. 147, n. 861, 1934.

HALL, A. et al. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 3, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. **Oxford University Press**, 2015.

HEDBACKER K, CARLSON M. SNF1/AMPK pathways in yeast. **Frontiers in Bioscience**, v. 13 2408-2420, 2008

FENTON, H. J. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, 1894.

HAMILL P, et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*. 10(1) 5948. 2020.

HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1217–1235, 2008.

HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. The intermembrane space of mitochondria. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, n. 9, p. 1341–1358, 2010.

HOEHNE, M. N. et al. Spatial and temporal control of mitochondrial H₂O₂ release in intact human cells. **The EMBO Journal**, v. 41, n. 7, p. 1–16, 2022.

HOFMANN, S. et al. The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1-TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, 2002.

HU, J.; DONG, L.; OUTTEN, C. E. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, 2008.

IEVA, R. et al. Article Mgr2 Functions as Lateral Gatekeeper for Preprotein Sorting in the Mitochondrial Inner Membrane. **Molecular Cell**, v. 56, p. 641–652, 4 dez. 2014.

ILLÉS, E. et al. The Fe II (citrate) Fenton reaction under physiological conditions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 111018, 2020.

JACOBS, L; RIEMER, J. Maintenance of small molecule redox homeostasis in mitochondria. *FEBS Letters*, 597. 205-223, 2022.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W.; WOOD, P. M. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1504, n. 2–3, p. 179–195, 2001.

JIANG H, et al. Quantitative 3D imaging of whole, unstained cells by using X-ray diffraction microscopy. **PNAS**, 107(25) 11234-11239. 2010.

KAYIKCI Ö, NIELSEN J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 15(6), 2015.

KARNKOWSKA, A. et al. A eukaryote without a mitochondrial organelle. **Current Biology**, v. 26, n. 10, p. 1274–1284, 2016.

KOEHLER, C. M. et al. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. **PNAS**, v. 96, n. 5, 1999.

KOJER K, et. al. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. **The EMBO Journal**. 31(14) 3169-3182, 2012.

KONDADI, A. K.; ANAND, R.; REICHERT, A. S. Cristae Membrane Dynamics – A Paradigm Change. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 12, p. 923–936, 1 dez. 2020.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondrial morphology regulates organellar Ca²⁺ uptake and changes cellular Ca²⁺ homeostasis. **FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13176–13188, 2019.

LALÈVE A, et. al. The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth. **Redox Biology**. 7 21-29, 2016.

LI, C. C. et al. Structural and biochemical analysis of 1-Cys peroxiredoxin ScPrx1 from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1864, n. 12, 1 dez. 2020.

LILL, R.; FREIBERT, S.-A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, n. 1, p. 471–499, 2020.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress in yeast. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 3, p. 281–296, 2010.

MANNELLA, C. Consequences of Folding the Mitochondrial Inner Membrane. **Frontiers in Physiology**. 11(June) 1-7, 2020.

MANNELLA, C. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 5–6, p. 542–548, 2006.

MARGULIS, L. Genetic and Evolutionary Consequences of Symbiosis. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**, v. 39, p. 277–349, 1976.

MARGULIS, L. Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. **New Haven, Yale University Press**. 1970.

MARTIN, W. F.; GARG, S.; ZIMORSKI, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1678, 26 set. 2015.

MARTIN, W.; HERRMANN, R. G. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why?1. **Plant Physiology**, v. 118, n. 1, p. 9–17, 1998.

MEIER, S.; NEUPERT, W.; HERRMANN, J. M. Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 170, n. 6, p. 881–888, 2005.

MILLARE, B.; O'ROURKE, B.; TRAYANOVA, N. Hydrogen peroxide diffusion and scavenging shapes mitochondrial network instability and failure by sensitizing ROS-induced ROS release. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

MOHD, U.; SAYYED, H.; MAHALAKSHMI, R. Mitochondrial protein translocation machinery: From TOM structural biogenesis to functional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 5, p. 101870, 2022.

MONTEIRO, G. et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 4886–4891, 2007.

MONTEIRO, G.; NETTO, L. E. S. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 2, p. 221–228, 2004.

MONTEIRO, G.; PEREIRA, G. A. G.; NETTO, L. E. S. Regulation of mitochondrial thioredoxin peroxidase I expression by two different pathways: One dependent on cAMP and the other on heme. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 278–288, 2002.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 4, p. 1157–1195, 2012.

MORDAS, A.; TOKATLIDIS, K. The MIA Pathway: A Key Regulator of Mitochondrial Oxidative Protein Folding and Biogenesis. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, 18 ago. 2015.

MOULIN, C.; CAUMONT-SARCOS, A.; IEVA, R. Mitochondrial presequence import: Multiple regulatory knobs fine-tune mitochondrial biogenesis and homeostasis. **BBA-Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 5, p. 930–944, 2019.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

MURPHY, M. P. et al. **Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. Cell Metabolism**, 2011.

NAPOLI, E. et al. Defective mitochondrial disulfide relay system, altered mitochondrial morphology and function in Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 5, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. **Artmed**. 2011.

NETTO, L. E. S. et al. Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 146, n. 1- 2 SPEC. ISS., 2007.

NETTO, L. E. S.; ANTUNES, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 65–71, 2016.

NG Y, TURNBULL, D. Mitochondrial disease: genetics and management. **Journal of Neurology**. 263(1) 179-191, 2016.

NUNOMURA, A. et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 60, n. 8, p. 759–767, 2001.

O'ROURKE, B. Mitochondrial ion channels. **Annual review of physiology**, v. 69, p. 19–49, mar. 2007.

PALADE, G. E. The Fine Structure of Mitochondria. **Anat Rec.**, v. 114, n. 3, p. 427–451, 1952.

PEDRAJAS, J. R. et al. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16296–16301, 2000.

PEDRAJAS, J. R. et al. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, n. 3, p. 249–258, 2010a.

PEDRAJAS, J. R. et al. Mitochondrial 1-Cys-peroxiredoxin/thioredoxin system protects manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) against inactivation by peroxynitrite in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 206–213, 2010b.

PEDRAJAS, J. R. et al. Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed during the Catalytic Cycle. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 24, n. 3, 2016.

PHAM-HUY L, HE H, PHAM-HUY C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2), 2008.

PLANK, M. Interaction of TOR and PKA Signaling in *S. cerevisiae*. **Biomolecules**, 12(2), 2022.

PORCELLI, A. M. et al. pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 4, 2005.

PRIESNITZ, C.; PFANNER, N.; BECKER, T. Studying protein import into mitochondria. Em: **Methods in Cell Biology**. 1. ed. Elsevier Inc., v. 155p. 45–79. 2020

RAMPELT, H. et al. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 4, p. 737–746, 2017.

RAFELSKI, S. et al. Mitochondrial network size scaling in budding yeast. **Science**, 338(6108) 822-824. 2012.

READ, A. D. et al. Mitochondrial iron–sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. **Redox Biology**, v. 47, p. 102164, 2021.

RHEE, S. G. et al. Critical Review Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. **IUBMB Life**, v. 52, p. 35–41, 2001.

RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, 2012.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 1–5, 2016.

RHEE S, KIL I. Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. **Annual Review of Biochemistry** 86 749-775, 2017.

RHEE, S. G.; WOO, H. A. Multiple functions of peroxiredoxins: Peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781–794, 2011.

RISSLER, M. et al. The Essential Mitochondrial Protein Erv1 Cooperates with Mia40 in Biogenesis of Intermembrane Space Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 3, out. 2005.

ROGER, A. J.; MUÑOZ-GÓMEZ, S. A.; KAMIKAWA, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1177–R1192, 2017.

ROLFE M, et. al. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**. 194(3) 686-701. 2012.

ROSCOE, J. M.; SEVIER, C. S. Pathways for Sensing and Responding to Hydrogen Peroxide at the Endoplasmic Reticulum. **Cells**, 2020.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 14, n. 3, 1967.

SANZ P, VIANA R, GARCIA-GIMENO M. AMPK in Yeast: The SNF1 (Sucrose Non-fermenting 1) Protein Kinase Complex. **EXS**, 107 353-374, 2016.

SARASTE M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science** (New York, N.Y.), 283(5407), 1488–1493, 1999.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial diseases. **The Lancet**, v. 379, n. 9828, p. 1825–1834, 2012.

SCHAPIRA, A. H. V. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 333, n. 8649, 1989.

SCHMIDT, O.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 655–667, 2010.

SEEL A, et al. Regulation with cell size ensures mitochondrial DNA homeostasis during cell growth. **bioRxiv**. 12.03.471050. 2021.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, 1 abr. 2017.

SIES, H. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 499–515, 1 jul. 2022.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, 2017.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2020.

STEGMAIER K, et. al. Atp1 and Aim32 Are Prototypes of Bishistidiny-Coordinated Non-Rieske [2Fe–2S] Proteins. **Journal of the American Chemical Society**.141(14) 5753-5765, 2019.

TUCKER, K.; PARK, E. Cryo-EM structure of the mitochondrial protein-import channel TOM complex at near-atomic resolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 26, n. 12, p. 1158–1166, 2019.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; POTTER, S. Z. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, 2005.

VAN DER LAAN, M. et al. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 4, p. 185–192, 2012.

VAN DER LAAN, M.; HORVATH, S. E.; PFANNER, N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 41, p. 33–42, 2016.

VAN LOON, A. P. G. M.; SCHATZ, G. Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the “sorting” domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 8, p. 2441–2448, 1987.

VOGEL, F. et al. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 2, p. 237–247, 23 out. 2006.

VÖGTLE, F. N. et al. Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 428–439, 2009.

VÖGTLE F, et. al. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Molecular and Cellular Proteomics*. 11(12) 1840-1852, 2012.

VÖGTLE, F. N. et al. Landscape of submitochondrial protein distribution. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

WALKER, C. L. et al. Redox regulation of homeostasis and proteostasis in peroxisomes. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, 2018.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365–381, 2011.

WANG, Y. et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 6, p. 1915–1928, 1 jun. 2018.

WIEDEMANN, N.; PFANNER, N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 685–714, 2017.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 83, p. 969–974, 1995.

WOOD Z, POOLE L, KARPLUS P. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, **Science**, 300(5619), 2003.

WURM, C. A.; JAKOBS, S. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. **FEBS Letters**, v. 580, n. 24, p. 5628–5634, 2006.

ZHANG D, et. al. Aim32 is a dual-localized 2Fe-2S mitochondrial protein that functions in redox quality control. **Journal of Biological Chemistry**. 297(4), 2021.

ZICK, M.; RABL, R.; REICHERT, A. S. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 1, 2009.

ZIMORSKI, V. et al. Endosymbiotic theory for organelle origins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 22, p. 38–48, 1 dez. 2014.