



Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio

Joana Manuela Capela Pires

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

ORIENTADORES: *Isabel Maria Simão Alves Pereira Ferreira*
Rui Manuel Alves Ferreira

ÉVORA, ABRIL DE 2017



“Podia ter sido fácil e cheio de sorrisos,
mas a nossa história sempre foi escrita
sobre mares de lágrimas...

podia ter sido simples, mas...

teríamos ficado na História sem a
ajuda do Adamastor?”

JC

Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho, não posso deixar de agradecer ao conjunto de pessoas que permitiram reunir um sem número de fatores que viabilizaram a sua realização, sem os quais não teria vivido da mesma forma esta atividade de investigação. Assim não posso deixar de agradecer com o maior carinho do mundo:



Aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Alves-Pereira, pela presença constante, e pelo incentivo a fazer sempre mais e melhor.



Ao ICAAM (Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas), pela utilização do espectrómetro de fluorescência, bem como, pelo apoio financeiro para a concretização deste projeto por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011 e PEst-OE/AGR/UI0115/2014.



Ao Departamento de Química da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, pela disponibilidade de espaço laboratorial e equipamentos.



À D.^a Custódia, D.^a Esperança e D.^a Anabela por toda a ajuda no trabalho desenvolvido no laboratório.



À Marta Candeias, Laura Ferreira, Amélia Romano, Juliana Agostinho, Vanessa Paixão, Joana Ferreira, Sofia de Jesus, Ana Rebocho, Inês Pereira, Ana Casquinha, Tiago Pita, Andreia Coimbra, Vanda Salgueiro, Arminda Serrano, Ana Sequeira, Joana Silva, João Farinhas, Miguel Camões, Pedro Lopes e Hugo Caeiro pela vossa inestimável amizade e pelas vezes que me aturaram e ouviram.



À minha família, minha essência e suporte de todas as horas, AMO-VOS, espero um dia poder recompensar-vos POR TUDO ☺ .



À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, meus 3 amores simplesmente ADORO-VOS, vocês sabem o quanto (LY).



A Deus, pela existência deste mundo e de todas as pessoas maravilhosas que conheci, que à sua maneira vão desenhando na minha vida um destino, como um artista desenha numa tela, tentando criar felicidade a cada gesto, e amor em cada olhar.

Índice

Agradecimentos	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de quadros	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
Abreviaturas e acrónimos	xv
1. Fundamento teórico	1
1.1. Nota Prévia	3
1.2. Efeitos Pasteur, Warburg e Crabtree	9
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – aplicações a estudos bioquímicos	14
1.4. Metabolismo energético.....	20
1.4.1. Compartimentação celular e metabolismo do NADH	20
1.4.2. Cadeia respiratória em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.4.3. Fosfatase alcalina e biodisponibilização de fosfato	23
1.4.4. Alguns enzimas envolvidos no efeito Crabtree	24
1.5. <i>Stress</i> oxidativo e resposta antioxidante em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
1.6. Influência da temperatura em sistemas biológicos	45
1.7. Nanopartículas de dióxido de titânio	49
2. Problema e objetivos	55
3. Metodologia	59
3.1. Estratégia	61
3.2. Diagrama do trabalho	63
3.3. Procedimento experimental	64
3.3.1. Cultura de microrganismos e delineamento dos ensaios	64
3.3.2. Procedimentos preambulares	65
3.3.2.1 Preparação de nanopartículas	65
3.3.2.2. Determinação do peso seco	67
3.3.2.3. Fracionamento celular	67
3.3.2.4. Quantificação de proteínas	68
3.3.3. Influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico em <i>S. cerevisiae</i>	69
3.3.3.1. Cálculo da taxa específica de crescimento	69
3.3.3.2. Determinação da viabilidade celular	70

3.3.3.3. Fosfatase alcalina.....	70
3.3.4. Influência das condições de cultura no metabolismo energético de <i>S. cerevisiae</i>	71
3.3.4.1. Hexocinase.....	71
3.3.4.2. Piruvato cinase.....	72
3.3.4.3. Piruvato descarboxilase.....	72
3.3.4.4. Álcool desidrogenase.....	73
3.3.4.5. Lactato desidrogenase.....	73
3.3.4.6. Citrato sintase.....	74
3.3.4.7. Succinato desidrogenase.....	74
3.3.4.8. NADH ubiquinona desidrogenase I.....	75
3.3.4.9. Malato desidrogenase.....	75
3.3.4.10. Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	76
3.3.5. Influência das condições de cultura na capacidade antioxidante de <i>S. cerevisiae</i>	76
3.3.5.1. Glutationo redutase.....	77
3.3.5.2. Glutationo peroxidase.....	77
3.3.5.3. Superóxido dismutase.....	78
3.3.5.4. Catalase.....	79
3.3.5.5. Glutationo e dissulfureto de glutaciono.....	79
3.3.5.6. Espécies reativas de oxigénio.....	80
3.3.5.7. Peroxidação lipídica.....	81
3.3.6. Análise estatística dos resultados.....	82
3.4. Equipamento.....	86
3.5. Reagentes.....	87
4. Resultados e discussão.....	89
4.1. Influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
4.2. Influência das condições de cultura no metabolismo energético de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96
4.3. Influência das condições de cultura na capacidade antioxidante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
5. Conclusões.....	127
6. Considerações finais.....	137
7. Referências bibliográficas.....	145
8. Anexos.....	165

Índice de Figuras

Figura 1.1 Representação esquemática da interação metabólica e localização celular de algumas vias implicadas no metabolismo energético e antioxidante de <i>S. cerevisiae</i> . 7	
Figura 1.2 Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em presença de glicose.....	16
Figura 1.3 Representação esquemática da cadeia respiratória de <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 1.4 Definição de diferentes classes de partículas.....	49
Figura 3.1 Diagrama representativo do delineamento das condições experimentais nos ensaios estabelecidos para o estudo da influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, na viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico, no metabolismo energético e na capacidade antioxidante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	65
Figura 3.2 Espectro de absorção molecular de TiO ₂ -NP.....	66
Figura 4.1 Taxa específica de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	93
Figura 4.2 Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i>	94
Figura 4.3 Atividade enzimática ALP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	95
Figura 4.4 Atividades enzimáticas hexocinase (A) e piruvato cinase (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	98
Figura 4.5 Atividades enzimáticas piruvato descarboxilase (A) e álcool desidrogenase (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	100
Figura 4.6 Atividade enzimática lactato desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	102
Figura 4.7 Atividades enzimáticas citrato sintase (A) e succinato desidrogenase (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	104
Figura 4.8 Atividade enzimática NADH desidrogenase externa 1 de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	107
Figura 4.9 Actividade enzimática enzima malato desidrogenase mitocondrial (A) e enzima malato desidrogenase citoplasmático (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	110
Figura 4.10 Actividade enzimática glicose-6-fosfato desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	113
Figura 4.11 Atividade enzimática glutatióno redutase (A), e glutatióno peroxidase (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	116
Figura 4.12 Atividade enzimática superóxido dismutase 1 (A), e superóxido dismutase 2 (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	118
Figura 4.13 Atividade enzimática catalase citoplasmática (A), e catalase peroxissomal (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	120
Figura 4.14 Conteúdo em glutatióno (A), e dissulfureto de glutatióno (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	122
Figura 4.15 Conteúdo em GSH + 2GSSG (A), e GSH/GSSG (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	124

Figura 4.16 Conteúdo em espécies reativas de oxigénio (A), e malonaldeído (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	125
---	-----

Índice de quadros

Quadro A.1 Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros analisados de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ em meio YPG, YPGD, YPGD na ausência de TiO ₂ -NP e na presença de TiO ₂ -NP <25 nm ou TiO ₂ -NP <100 nm, em condições de choque térmico ou não, durante 100 ou 200 min.	167
---	-----

Resumo

Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio

O efeito Crabtree ou repressão do metabolismo respiratório pela glicose, detetado em diversas espécies de levedura, assemelha-se à glicólise aeróbia de células tumorais. Este estudo procurou confirmar a ocorrência dessa alteração metabólica em *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, bem como testar a capacidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP), com diferente diâmetro molecular, para modular esse fenómeno. Os resultados obtidos, confirmam que a estirpe UE-ME₃ é uma levedura Crabtree positiva, uma vez que a adição de glicose a células respiratórias provocou um aumento da taxa específica de crescimento e viabilidade celular, bem como alterações de atividades enzimáticas que evidenciam bloqueio catabólico do ciclo do citrato e da cadeia respiratória, acompanhado pela atenuação da resposta antioxidante mediada pelo tripéptido glutationo e atividades enzimáticas dependentes do glutationo. A exposição de *S. cerevisiae* a TiO₂-NP com diâmetro molecular inferior a 100 nm, em choque térmico 28/40 °C, durante 200 min evitou a transição do metabolismo respiratório para respiratório-fermentativo, pela adição de glicose, evidenciado pela manutenção da taxa específica de crescimento, atividades enzimáticas ALP e ADH e níveis intracelulares de MDA, próximos dos detetados em células respiratórias, assim como, pelo decréscimo da viabilidade celular, das actividades HXK, PDC, G6PD e SOD1, aumento das actividades SDH, MDH2, NDE1 e conteúdo em ROS, marcadores do metabolismo respiratório ativo. A adição de nanopartículas de dióxido de titânio, com diâmetro molecular inferior a 25 nm, a *S. cerevisiae*, mantidas 100 min em condições Crabtree, despoletou a reversão parcial do efeito, ocorrendo decréscimo das actividades PDC e ADH, aumento das actividades CS, SDH e de níveis intracelulares de GSH, GSSG e MDA.

Palavra chave: levedura; fermentação aeróbia; antioxidantes.

Abstract

Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae* and its modulation by titanium dioxide nanoparticles

The Crabtree effect or catabolic repression of respiratory metabolism by glucose, detected in several yeast species is similar to the aerobic glycolysis of tumor cells. This study sought to confirm the occurrence of this metabolic change in *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, as well as test the ability of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP), with different molecular diameter, to modulate this phenomenon. The results confirm that the UE-ME₃ strain is a Crabtree-positive yeast, since the addition of glucose to respiratory cells caused an increase of specific growth rate and cell viability as well as changes in enzyme activities that demonstrate a catabolic blockage of citrate cycle and respiratory chain, followed by a slowdown in the antioxidant response mediated by tripeptide glutathione and enzyme activities glutathione-dependent. The exposure of *S. cerevisiae* to TiO₂-NP with a molecular diameter less than 100 nm in heat shock conditions 28/40 ° C, for 200 min has avoided the transition from respiratory to respiratory-fermentative metabolism, by the addition of glucose, as evidenced by maintenance of specific growth rate, ALP and ADH enzyme activities and MDA cell levels near of detected in respiratory cells, as well as by a decrease of cell viability, HXK, PDC, G6PD and SOD1 enzyme activities and an increase of SDH, MDH2, NDE1 enzyme activities and ROS content, markers of active respiratory metabolism. The addition of titanium dioxide nanoparticles with a molecular diameter less than 25 nm to *S. cerevisiae*, maintained at 100 min in Crabtree conditions, triggered a partial reversion of this effect, occurring a decrease PDC and ADH activities, an increase in CS SDH activities and cell levels of GSH, GSSG, and MDA.

Keyword: yeast; aerobic fermentation; antioxidants

Abreviaturas e acrónimos

μ	Taxa específica de crescimento
6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44)
6PGL	6-fosfogluconolactonase (EC 3.1.1.31)
ADH	Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)
ADP	Adenosina difosfato
ALP	Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CAD	Cinamil álcool desidrogenases
CFU	Unidades formadoras de colónias
COG	Do inglês <i>Clusters of Orthologous Groups</i>
CS	Citrato sintase (EC 2.3.3.1)
CTA1/CTT1	Catalases (EC 1.11.1.6)
Cys	Resíduo de cisteína
DLD	Lactato desidrogenase (EC 1.1.2.4)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Enzima
Ea	Energia de ativação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F6P	Frutose 6-fosfato
FAD +	Dinucleótido de flavina e adenina
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
FBP	Frutose 1,6- difosfato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GDP	Guanosina difosfato
Glu	Resíduo de glutamato
GPx	Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.8.1.7)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutationo
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HOCl	Ácido hipocloroso
HS	Choque térmico
HXK	Hexocinase (EC 2.7.1.1)
K	Coeficiente de velocidade
MAE1	Malato desidrogenase mitocondrial (EC 1.1.1.38)
MDA	Malonaldeído

MDH1	Malato desidrogenase mitocondrial (EC 1.1.1.37)
MDH2	Malato desidrogenase citoplasmático (EC 1.1.1.37)
MDH3	Malato desidrogenase peroxissomal (EC 1.1.1.37)
MÊS	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfónico
METAFor	do inglês <i>METAbolic Flux Ratio analysis</i>
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NBT	Nitrozol de tetrozól
NDE1	NADH ubiquinona oxidoreductase 1 (EC 1.6.5.3)
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
NO•	Radical óxido nítrico
NP	Nanopartículas
NP <100	Nanopartículas com diâmetro inferior a 100 nanómetros
NP <25	Nanopartículas com diâmetro inferior a 25 nanómetros
O ₂ • ⁻	Radical anião superóxido
OH•	Radical hidroxilo
OPT	<i>o</i> -fetaldeído
ORF	Sequência de DNA que engloba as regiões reguladoras e codificante de um gene, do inglês <i>open reading frame</i>
PDC	Piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1)
PDH	Piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1)
Pfam	Do inglês Pfam <i>protein domain database</i>
Pi	Fosfato inorgânico
Pnp	<i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -Nitrofenilfosfato
PP	Via das pentoses fosfato
PYK	Piruvato cinase (EC 2.7.1.40)
QH2	Ubiquinol
R	Coefficiente de correlação
R	Constante dos gases perfeitos
R5P	Ribose 5-fosfato
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RS	Espécies reativas
Ru5P	Ribulose-5-fosfato
S	Substrato
SDH	Succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1)
SOD1/SOD2	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
T	Temperatura
TCA	Ciclo do citrato
TEM	Tampão Tris-acetato (0,05M) pH 7,5; EDTA (1mM) e manitol (0,25 M)
TPP	Tiamina pirofosfato
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Z	Frequência de colisões

1. Fundamento teórico

1.1. Nota Prévia

A sobrevivência de qualquer organismo vivo depende essencialmente da sua capacidade para mobilizar o potencial químico acumulado nas ligações químicas dos nutrientes e assim assegurar o seu funcionamento. Lagos e oceanos primitivos constituíram locais de reserva de nutrientes que os primeiros seres vivos, presumivelmente procariontes heterotróficos, metabolizavam com recurso a mecanismos rudimentares como a fermentação, ainda hoje amplamente expressa em diversos sistemas celulares (1) (2) (3).

O aparecimento dos primeiros organismos autotróficos, dotados de capacidade para produzir o seu próprio alimento via fotossíntese, constituiu um importante passo evolutivo, não só por serem capazes de assegurar diretamente a sua sobrevivência mas também por se terem tornado fonte nutricional renovável dos seres heterotróficos (1).

A acumulação do dióxigénio (O_2) na atmosfera terrestre, como subproduto da fotossíntese, permitiu que alguns organismos procariontes passassem a utilizar o poder oxidante dessa molécula em processos mais rentáveis de mobilização do potencial químico dos nutrientes que posteriormente deram origem à respiração celular (4). Esses seres vivos passaram então a utilizar glúcidos, ácidos gordos e aminoácidos como substratos alimentares, tornando-se a glicose o substrato preferencial quer no metabolismo fermentativo quer no metabolismo respiratório (5).

No final do século XIX, o químico germânico Buchner revelou pela primeira vez que a conversão da glicose em piruvato, etanol ou lactato, acoplada à formação de adenosina trifosfato (ATP), podia ser observada *in vitro*. A continuidade desta descoberta, um marco relevante do avanço do conhecimento humano sobre o metabolismo celular, foi assegurada pelos bioquímicos Embden, Meyerhof e Parnas que contribuíram para o esclarecimento completo da via glicolítica ou de Embden-Meyerhof-Parnas, desde o precursor glicose até ao intermediário piruvato (6) (Figura 1.1). O descodificar do destino metabólico do piruvato por diferentes vias, como a fermentação alcoólica onde é convertido em etanol e dióxido de carbono, a fermentação acética onde é transformado em acetato ou a fermentação láctica com produção de lactato constitui outro marco importante dos primeiros passos da descoberta do metabolismo celular (3) (5) (7) (Figura 1.1).

A maior parte das espécies de levedura são capazes de converter glúcidos em etanol e dióxido de carbono. Contudo, essa propriedade não implica que exibam uma boa taxa específica de crescimento na ausência total de dioxigénio (8) (9) (10).

Embora o nível de O₂ ambiental constitua um fator regulador-chave do metabolismo da glicose em leveduras, uma vez que também são capazes de converter glúcidos em dióxido de carbono e água, pela via respiratória, a fermentação predomina frequentemente sobre a respiração quando os níveis de glicose do meio são elevados, mesmo em condições aeróbias, permitindo deste modo, a reoxidação dos equivalentes redutores, sob a forma de NADH + H⁺, gerados pela glicólise (Figura 1.1) (11) (12) (13).

Desta forma, as leveduras envolvidas no metabolismo dos glúcidos podem ser classificadas como microrganismos: (i) aeróbios restritos, quando apresentam metabolismo exclusivamente respiratório, como por exemplo, a espécie *Rhodotorula glutinis*; (ii) fermentativos facultativos, se apresentam alternadamente metabolismo respiratório ou fermentativo, como as espécies *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia jadinii*; e (iii) fermentativos restritos, se adoptam metabolismo exclusivamente fermentativo como a espécie *Candida slooffii* (8) (14). A maior parte das leveduras identificadas como fermentativas facultativas, podem exibir metabolismo totalmente respiratório, totalmente fermentativo ou até metabolismo respiratório-fermentativo, consoante o tipo e o nível de concentração de glúcidos do meio e/ou a disponibilidade em dioxigénio (15) (16).

Embora o tipo de glúcidos que suportam o crescimento de leveduras difira de espécie para espécie, a maior parte das estirpes nativas utilizam a glicose como principal fonte de carbono. No entanto, nem todas transformam esse substrato alimentar em etanol (17).

As leveduras Crabtree-positivas, tais como a *Saccharomyces cerevisiae*, utilizam preferencialmente a via fermentativa para oxidarem equivalentes redutores sob a forma de NADH quando crescem em meios ricos em glicose, mesmo na presença de dioxigénio. Este fenómeno acontece devido à inativação da via respiratória pela glicose e não depende da disponibilidade de dioxigénio do meio (18).

Assim, as estirpes vínicas consomem preferencialmente glicose por fermentação alcoólica (19) (20) (21). A conversão do piruvato, produto da via glicolítica, em etanol envolve um passo de descarboxilação a acetaldeído, catalisado pelo enzima piruvato

descarboxilase (PDC), seguido pela redução do acetaldeído a etanol pelo enzima álcool desidrogenase (ADH) (Figura 1.1). O etanol, eventualmente após o desvio diaúxico, é metabolizado pela via respiratória, levando à formação acoplada de ATP. A *S. cerevisiae* pode assim metabolizar uma ampla variedade de fontes de carbono, incluindo compostos não fermentáveis tais como o etanol e o glicerol (22). O metabolismo oxidativo desses compostos através do ciclo do citrato e da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é mais eficiente na produção de ATP, embora o uso do dióxigénio como aceitador final de elétrons possa contribuir para gerar espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como o radical anião superóxido, potencialmente prejudiciais para a célula (23) (Figura 1.1). As vias metabólicas necessárias para a utilização específica dessas fontes de carbono encontram-se bem caracterizadas e geram na sua grande maioria piruvato (2) (5) (Figura 1.1).

O piruvato encontra-se localizado na interseção de duas vias catabólicas essenciais à célula: glicólise e ciclo do citrato. Este derivado metabólico, produto final da glicólise, é libertado no citoplasma e transportado para a matriz mitocondrial onde após conversão em acetil-CoA é metabolizado pelo ciclo do citrato para gerar equivalentes redutores utilizados pela cadeia respiratória durante a fosforilação oxidativa (Figura 1.1). Contudo, quando a célula se encontra em modo preferencialmente fermentativo, o piruvato permanece no citoplasma onde é subsequentemente reduzido, tendo em vista a reoxidação do NADH citoplasmático indispensável à glicólise (Figura 1.1). Em condições fermentativas, a disponibilidade de piruvato para o ciclo do citrato encontra-se fortemente constrangida por baixos níveis de expressão do complexo piruvato desidrogenase (PDH) enquanto a sua metabolização citoplasmática torna-se significativamente ativada. Em *S. cerevisiae*, a redução do piruvato citoplasmático dá-se via piruvato descarboxilase cujo produto, o acetaldeído, pode ser posteriormente oxidado na matriz mitocondrial ou reduzido a etanol pelo enzima álcool desidrogenase, acoplado à reoxidação de NADH (2) (24) (Figura 1.1).

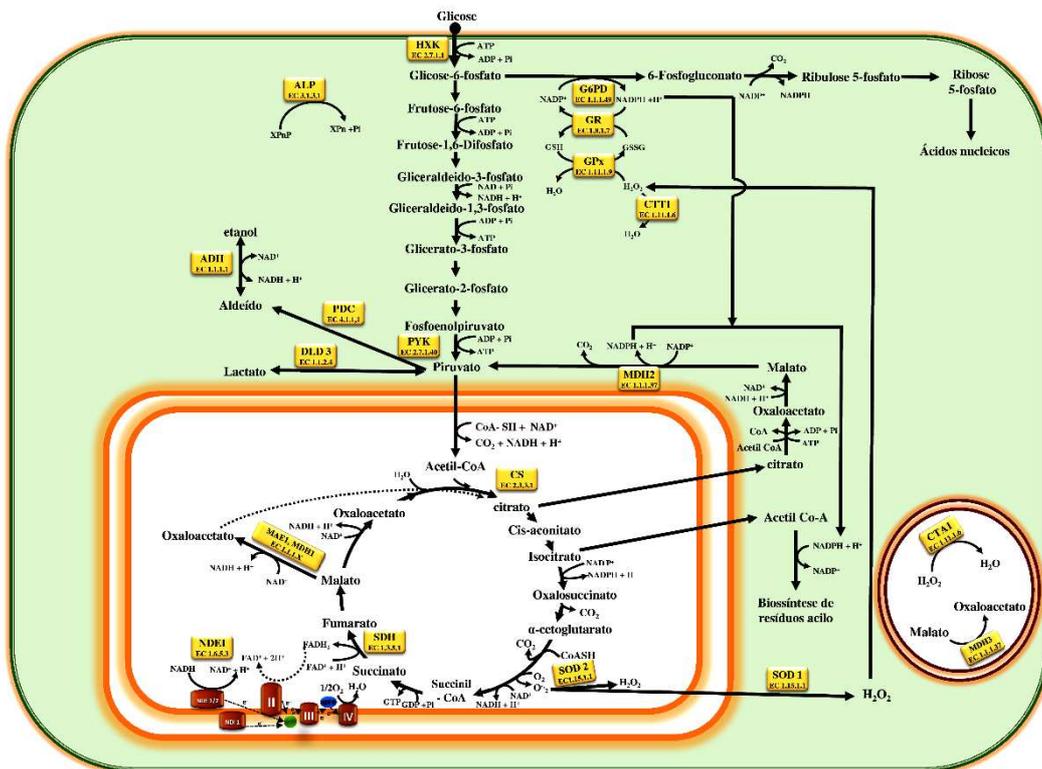


Figura 1.1 Representação esquemática da interação metabólica e localização celular de algumas vias implicadas no metabolismo energético e antioxidante de *S. cerevisiae*. (adaptado de (25) (26)).

1.2. Efeitos Pasteur, Warburg e Crabtree

No século XIX, Louis Pasteur (1861) observou que leveduras fermentativas facultativas como a *S. cerevisiae* consumiam muito mais hexoses, como a glicose, na ausência de dioxigénio do que na sua presença. Esta resposta metabólica passou então a ser conhecida como efeito Pasteur. No entanto, desde essa altura que têm surgido publicações confusas sobre este assunto, como aquela em que Szent-Györgyi em 1937 assumia que a supressão da oxidação de hexoses por carência de dioxigénio, dava lugar à fermentação (27). Contudo, essa afirmação não é de todo verdadeira, uma vez que o efeito Pasteur apenas se manifesta quando *S. cerevisiae* cresce em condições experimentais especiais, nomeadamente a taxa específica de crescimento lenta em culturas contínuas, com níveis restritivos de glúcidos, ou em células em estado estacionário, onde ocorre uma acentuada contribuição da respiração para o catabolismo glucídico, devido à perda da capacidade fermentativa (15) (28).

No seguimento das observações de Pasteur, os investigadores Meyerhof e Warburg (1920) examinaram, as diferenças entre a degradação de glúcidos em condições aeróbias e anaeróbias por leveduras, tecido muscular e outros tecidos animais, tendo observado que o tecido muscular, entre outros, produzia lactato a partir de glúcidos, na ausência de dioxigénio (27). Por outro lado, Warburg ao comparar a taxa respiratória de determinadas células cancerígenas com as de células saudáveis de rato observou que as primeiras possuíam a mesma taxa de consumo de dioxigénio que as células saudáveis, mas uma taxa de formação de lactato muito superior, mesmo na presença de dioxigénio, fenómeno descrito na literatura como efeito Warburg (27) (29). Essas alterações ao nível do metabolismo energético permite-lhes sobreviver em condições adversas como a hipóxia, promovendo a sua proliferação, progressão, invasibilidade e subsequente metastização em locais distantes do tumor inicial (28). Estudos comparativos entre células cancerígenas e células saudáveis, realizados posteriormente, permitiram associar, o aumento da taxa de glicólise com a produção de lactato, bem como a perda de capacidade para oxidar o piruvato, pelas células cancerígenas, com o acréscimo da sua capacidade para importar glicose ((30), 2010). Nesse tipo de células tem sido ainda detetado um incremento da gliconeogénese, da atividade glutaminolítica, da via das pentoses fosfato, da síntese *de novo* de lípidos e do *turnover* do glicerol, acompanhado por um decréscimo das vias de oxidação de resíduos

acilo e de perturbações no metabolismo dos aminoácidos. Essas alterações metabólicas têm vindo a ser utilizadas no prognóstico e na terapia dirigida do cancro (31) (28) (32).

No metabolismo celular, a acumulação e a disponibilização seletiva do potencial químico necessário aos processos bioquímicos é fundamental. A degradação de nutrientes culmina em muitos casos na formação de acetil-CoA, o qual ao ser oxidado pelo ciclo do citrato liberta equivalentes redutores que são posteriormente utilizados pela cadeia respiratória para gerar ATP. Por exemplo, a glicose resultante da degradação de glúcidos mais complexos pode ser importada pela célula com recurso a transportadores transmembranares específicos. Uma vez no citoplasma, a via de Ebden-Meyerhof-Parnas metaboliza então a glicose com a redução de duas moléculas de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ e formação líquida de duas moléculas de piruvato e duas de ATP (Figura 1.1). O piruvato pode então ser transferido para o mitocondrio onde o complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH) o converte em acetil-CoA, intermediário que reage com o oxaloacetato para dar citrato, iniciando o ciclo do citrato, outro percurso metabólico gerador de equivalentes redutores sob a forma de NADH e FADH_2 que ao serem oxidados pela cadeia respiratória geram ATP, contribuindo com cerca de 90% do potencial químico necessário para o normal funcionamento da célula eucariote (28) (31) (Figura 1.1).

Face ao exposto, pode assumir-se que o mitocondrio desempenha um papel relevante no metabolismo energético, dado que é nesse organelo que é sintetizada a maior parte do ATP celular via fosforilação oxidativa. No entanto, algumas células cancerígenas suprimem o metabolismo mitocondrial, como descrito pelo efeito Warburg, alteração que as torna maioritariamente dependentes do metabolismo fermentativo para a produção de ATP, exibindo assim um fenótipo glicolítico aeróbio, fenómeno que parece contribuir para aumentar a taxa de proliferação celular. Essa alteração metabólica poderá também diminuir a formação de ROS intracelular, evitando que a célula defeituosa morra por apoptose (29). Alguns autores descrevem ainda a ocorrência de uma correlação estreita entre o fenótipo glicolítico e a invasividade tumoral (33). Contudo, não se pode generalizar essa perturbação a todo o tipo de células cancerígenas, uma vez que algumas delas conservam o mitocondrio funcional, obtendo o ATP necessário à sua sobrevivência através da fosforilação oxidativa (29). Além disso, também já foi demonstrado que algumas células cancerígenas podem alternar reversivelmente entre metabolismo fermentativo e oxidativo, dependendo da

disponibilidade de glicose e de outras condições do crescimento (34) (35) (36). Alguns estudos propõem um modelo que postula que as células “glicolíticas” podem estabelecer uma simbiose metabólica com as "oxidativas". Esta nova teoria torna de máxima importância o estudo do metabolismo energético de células cancerígenas. Uma característica deste tipo de células corresponde então à supressão induzida pela glicose da respiração celular, reversível e de curto prazo, por vezes designada por "efeito de Crabtree" (37) (38).

O efeito de Crabtree foi descoberto em 1926 por Herbert G. Crabtree quando realizava estudos relativos à utilização de glúcidos por células tumorais. Este autor observou que a glicose comportava-se como inibidor do metabolismo respiratório nesse tipo de células. O fenómeno parece não ser exclusivo das células cancerígenas, uma vez que tem sido detetado em células normais, com taxa de divisão elevada, como as da mucosa intestinal, embrionárias e do tecido renal, em leveduras e em bactérias (28).

Alguns investigadores têm procurado explicar o efeito Crabtree, postulando hipóteses mecanísticas que interpretem o silenciamento mitocondrial detetado em células cancerígenas, nomeadamente: (i) a competição entre a glicólise e a fosforilação oxidativa para o ADP e o fosfato inorgânico (Pi), a ocorrência de défice respiratório quando se aumenta a disponibilidade em glicose; (ii) o aumento da produção de ácido láctico, o conseqüente decréscimo do pH citoplasmático seguido pela inibição dos enzimas oxidativos; (iii) a indução pela glicose da libertação de iões cálcio do lúmen do retículo endoplasmático para o citoplasma, associada ao aumento dos níveis de cálcio mitocondrial implicado na associação das subunidades constituintes dos subcomplexos F1 e F0 do complexo multienzimático ATP sintase e sua conseqüente inibição; (iv) o aumento da produção de ROS pelo metabolismo da glicose com aumento de danos na membrana mitocondrial e conseqüente repressão do metabolismo respiratório; (v) a ocorrência de mecanismos multifacetados que envolvem alterações na razão ATP/ADP, no conteúdo em Pi, na atividade enzimática G6PD e no pH citoplasmático, entre outros, capazes de regular o referido efeito (39) (28) (40) (41).

Meyerhof observou que o consumo de dioxigénio por leveduras da cerveja, que cresciam apenas em meio tamponado ou enriquecido com glicose era semelhante (42) (43). Essa constatação de Meyerhof que foi posteriormente detetada em diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser resumida do seguinte modo: em meios

com níveis elevados de glicose o catabolismo glucídico é fermentativo, mesmo em culturas gaseificadas, não ocorrendo o efeito Pasteur (42) (44).

O efeito de Crabtree descreve assim um fenómeno pelo qual o crescimento respiratório de alguns tipos de leveduras como a *S. cerevisiae* é inibido ou reprimido pela presença de hexoses, em particular a glicose. Quando os níveis de glicose são elevados no meio de cultura a levedura consome preferencialmente esse substrato nutricional e só começa a utilizar outras fontes de carbono, como o etanol ou o glicerol quando a glicose se esgota. Desta forma é usualmente observada uma alteração no declive da fase exponencial da curva de crescimento das leveduras Crabtree-positivas devido à carência de glicose no meio, determinada pela reprogramação da expressão génica fermentativo-respiratória, previamente descrita e referenciada na literatura como desvio diáuxico (45) (46).

O efeito de Crabtree manifesta-se sempre que *S. cerevisiae* se encontra em condições totalmente aeróbias e utiliza glicose como fonte de carbono. Este fenómeno que depende da concentração de glicose no meio de cultura, determina o tipo de vias metabólicas que a célula adota para obter o ATP que sustenta o seu crescimento e sobrevivência. Em geral ocorre uma predominância da via fermentativa que inclui a glicólise e a fermentação alcoólica/láctica sobre a via respiratória, onde o piruvato é descarboxilado a acetil-CoA que é oxidado pelo ciclo do citrato para gerar equivalentes redutores sob a forma de NADH e FADH₂, utilizáveis pela cadeia respiratória para fosforilar ADP em ATP (Figura 1.1). A extensão em que o ciclo do citrato e a cadeia respiratória se expressam, depende da espécie de levedura e do efeito de Crabtree. A inibição do catabolismo glucídico pode ter origem no transporte de um glúcido particular para o interior celular que causa a inibição de outro sistema de transporte de outros glúcidos (32). Alguns estudos sugerem que a glicólise aeróbia pode ainda ser acompanhada por um aumento da taxa de absorção da glicose com acidificação do meio extracelular, uma resposta já descrita anteriormente como vantajosa para o seu crescimento. A taxa global de produção de ATP nesta situação torna-se então superior à taxa produzida pela respiração mitocondrial, com menores custos de produção enzimática ou de aumento das atividades enzimáticas fermentativas (31) (47) (48).

No entanto, a taxa de proliferação celular não depende apenas do suporte energético adequado sob a forma de nucleósido trifosfatos, mas também do fluxo de derivados de glicose ou de aminoácidos para as vias biossintéticas que suportam a

duplicação da biomassa ao longo do ciclo celular. Para além do consumo de energia e de precursores de compostos de carbono, o crescimento celular requer diversas reações anapleróticas que estabilizem os níveis de estado estacionário dos intermediários do ciclo do citrato ou que participem na estabilização do ambiente redox mediado pelos pares redox NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Alguns autores admitem ainda que o abrandamento da atividade mitocondrial e a consequente geração de ROS, poderão prevenir a morte celular por apoptose (49) (50).

Contudo, em células diferenciadas não proliferativas, as vias biossintéticas anapleróticas exibem níveis de expressão diminutos ou inexistentes, permitindo a oxidação completa da glicose no sentido da obtenção máxima de ATP (49).

A via das pentoses fosfato (PP), também conhecida como desvio metabólico das hexoses monofosfato ou via do fosfogluconato ramifica a partir do primeiro passo da glicólise, catalisado pela hexocinase e consome glicose-6-fosfato (G6P) como substrato primário (Figura 1.1). Apesar de Otto Warburg ter descoberto que este passo de oxidação da glicose-6-fosfato requeria NADP^+ como coenzima, foram Bernard Horecker, Fritz Lipman e Efraim Racker que esclareceram completamente a via PP, nos anos 50 do século XX (51) (52). Esses estudos revelaram ainda que para além do papel primário de gerar pentoses fosfato e ribonucleótidos, a via PP constituía a principal fonte de NADPH, desempenhando um papel essencial na estabilização do ambiente redox da célula. A via das pentoses fosfato engloba dois ramos: *i*) oxidativo e *ii*) não-oxidativo. O ramo oxidativo que gera NADPH e ribonucleótidos possui três passos irreversíveis. O primeiro passo, mediado pelo enzima G6PD, envolve a conversão da G6P em 6-fosfogluconolactona acoplada à redução de NADP^+ em NADPH. Este passo é seguido pela hidrólise da 6-fosfogluconolactona em 6-fosfogluconato, mediada pelo enzima fosfogluconolactonase (6PGL). O terceiro passo reacional envolve a descarboxilação oxidativa do 6-fosfogluconato em ribulose-5-fosfato (Ru5P), acoplada à redução de uma segunda molécula de NADP^+ em NADPH que é catalisada pelo enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). A Ru5P é então convertida em ribose-5-fosfato (R5P) (Figura 1.1). O ramo não-oxidativo inclui uma série de reações reversíveis que recrutam intermediários glicolíticos adicionais, como a frutose-6-fosfato (F6P) e o gliceraldeído-3-fosfato (G3P) que podem ser convertidos em pentoses fosfato e vice-versa (51) (52) (53) (54) (Figura 1.1). A natureza reversível deste ramo, assim como a regulação alostérea dos enzimas que participam nesta via permite que a via das

PP se adapte às necessidades metabólicas da célula, operando em diferentes modos. Quando é mais importante para a célula manter a homeostase redox do que sintetizar DNA, a via PP adapta-se acelerando o seu ramo oxidativo e desviando o ramo não oxidativo no sentido da formação de F6P a partir das pentoses fosfato que é convertida em G6P que reabastece o ramo oxidativo. Contudo, a maior parte das pentoses fosfato que são incorporadas no DNA de células replicativas, tem a sua origem na via PP (55). Consequentemente, a via PP pode ser desviada no sentido de gerar pentoses fosfato a partir de G6P pelo ramo oxidativo ou F6P e G3P pelo ramo não oxidativo (56) (57). O modo em que opera a via PP pode assim influenciar o fluxo da glicose na glicólise e vice-versa. A via das pentoses fosfato torna-se deste modo essencial para as células cancerígenas, porque não só gera pentoses fosfato necessárias à sua elevada taxa específica de crescimento, mas também porque gera equivalentes redutores sob a forma de NADPH indispensáveis à biossíntese *de novo* de resíduos acilo e à sua sobrevivência em condições de *stress*. Descobriu-se que as células cancerígenas são capazes de modular direta ou indiretamente o fluxo da via PP, no sentido de esta via providenciar os precursores necessários à biossíntese de ácidos nucleicos, bem como os equivalentes redutores indispensáveis à biossíntese de resíduos acilo e à sobrevivência celular que asseguram a sua elevada capacidade proliferativa. A ativação da via PP em células cancerígenas permite-lhes assim gerar níveis elevados de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que participam na redução de ROS, bem como níveis elevados de nucleótidos indispensáveis à síntese e reparação do DNA (58) (59).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* – aplicações a estudos bioquímicos

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarionte GRAS, vulgarmente utilizada há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas como a cerveja e o vinho. Atualmente assume ainda particular importância para o homem quando utilizada como organismo modelo em estudos de: *i*) caracterização da respostas ao *stress* oxidativo, osmótico ou alcoólico (60) (61); *ii*) genética molecular, sendo o microrganismo eucarionte cujo genoma foi primeiro sequenciado e *iii*) comparação metabólica com células cancerígenas. Apresenta forma ovóide com aproximadamente 10 μm de comprimento e exibe características estruturais e funcionais básicas comuns às de células eucariontes mais evoluídas, conservando, no entanto, algumas características semelhantes às das bactérias, como seja a capacidade para crescer

em diversos meios nutritivos, líquidos ou sólidos e taxa de replicação rápida quando cresce sem restrição de nutrientes. Essas propriedades permitem desenvolver estratégias experimentais com elevado controlo das condições de crescimento (62) (63) (64) (65). A composição do meio de cultura constitui um dos vários fatores que se torna necessário controlar quando se trabalha com *S. cerevisiae*, uma vez que a fonte de carbono disponível poderá induzir alterações, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas relevantes para a sua sobrevivência. Quando inoculada em meio de cultura que contenha uma fonte de carbono fermentável, como a glicose, a *S. cerevisiae* apresenta quatro fases distintas de crescimento: *i*) Fase lag, um período de adaptação ao novo meio, com taxa respiratória lenta que termina quando as células iniciam a fase seguinte; *ii*) fase log ou exponencial onde crescem rapidamente e a sua massa aumenta exponencialmente. Nesta fase, onde a taxa de morte pode ser considerada vestigial relativamente à sobrevivência celular, as necessidades energéticas das células são maioritariamente supridas via metabolismo fermentativo, ocorrendo a acumulação de etanol (Figura 1.2) (45). No entanto, se a fonte de carbono no meio de cultura for apenas glicerol ou piruvato, as células de *S. cerevisiae* manifestam mesmo em fase exponencial, metabolismo respiratório (66) (11) (67) (68) (69) (70); *iii*) A terceira fase do crescimento, pós-diáuxica, tem o seu início quando as células esgotam a maior parte da fonte de carbono fermentável, observando-se então grandes alterações fisiológicas e morfológicas (Figura 1.2). Nesta fase a expressão dos enzimas fermentativos encontra-se bloqueada e as células passam a utilizar a respiração como principal via de síntese de ATP, utilizando os produtos da fermentação, maioritariamente etanol e glicerol, como fontes de carbono; *iv*) As células entram em fase estacionária quando os nutrientes se esgotam, cessando a divisão celular ocorrendo um abrandamento do metabolismo. A respiração torna-se então vital para a sua sobrevivência.

As leveduras podem permanecer em fase estacionária durante semanas ou meses, ocorrendo indução da síntese de glúcidos de reserva como o glicogénio e a trealose e reestruturação da parede celular, até atingirem o declínio que culmina em morte celular (32) (69) (71) (72) (70).

A população de leveduras em fase estacionária subdivide-se em dois tipos de células: *i*) quiescentes, em fase G_0 e *ii*) não-quiescentes que apenas se formam durante a divisão celular final que ocorre na fase pós-diáuxica do crescimento. Em geral, as células não-quiescentes exibem níveis de ROS elevados e maior predisposição para

morrer por apoptose. As células quiescentes ao fim de um longo período de tempo de incubação, também passam a expressar marcadores de apoptose e posteriormente de necrose (73) (74) (75) (76) (77).

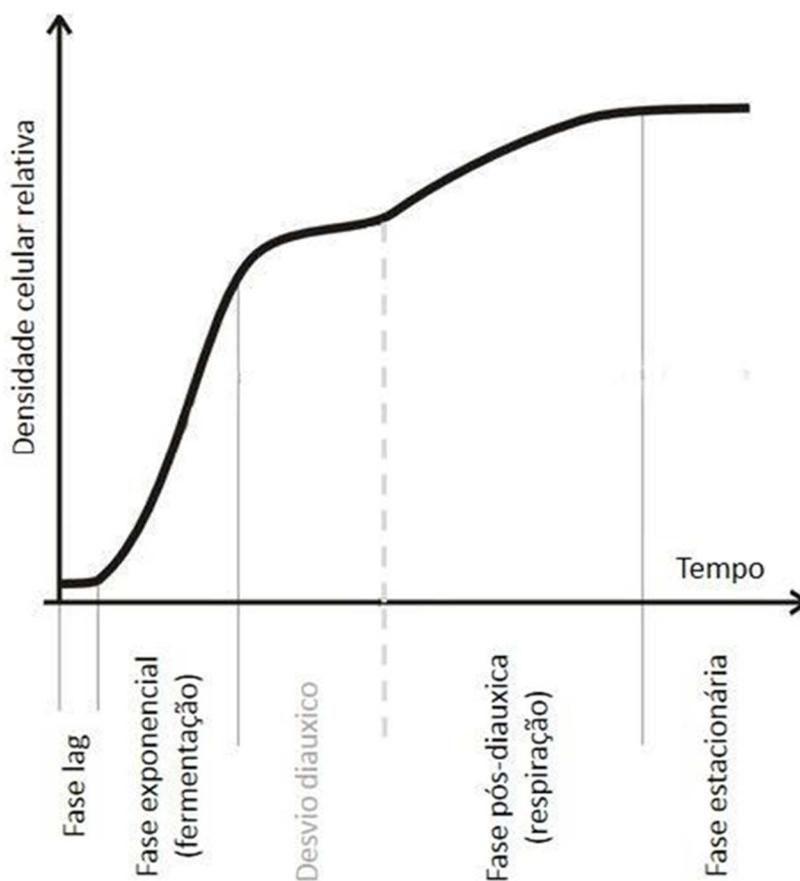


Figura 1.2 Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em presença de glicose onde a densidade celular foi estimada pela turbidez lida a 600 nm (adaptado de (78)).

A longevidade das leveduras pode ser determinada de acordo com dois paradigmas distintos: o envelhecimento cronológico que corresponde à perda de viabilidade celular durante o período estacionário do crescimento e o envelhecimento replicativo que corresponde ao número de células-filhas produzidas por cada célula individualmente (79). Marcadores característicos de apoptose que não se expressam em células em fase exponencial, têm sido detetados em células de *S. cerevisiae* em envelhecimento cronológico ou replicativo (75) (73) (74) (64) (80). Apesar de serem organismos unicelulares, as leveduras são por vezes capazes de desenvolver estruturas

de crescimento comunitárias em colónias ou em biofilme que possuem um elevado nível de complexidade e de organização interna (31) (81).

O crescimento biológico é um evento químico que não difere de qualquer reação química orgânica que ocorra em meio aquoso, excepto o facto de ser extremamente complexo, sendo impossível expressar de forma precisa as reações que têm lugar no interior celular nesse evento. É no entanto menos difícil escrever uma equação para o processo de crescimento em termos do estado inicial de substâncias que façam parte da composição celular e que entrem na composição das células em formação e do seu estado final, o qual engloba células e outros produtos do crescimento (82) (83).

O ambiente natural onde crescem os organismos vivos é aquele em que uma população localizada aumenta exponencialmente até exceder a sua capacidade ou encontrar fatores limitantes. A população então colapsa com a maior parte das células morrendo, revertendo a uma taxa metabólica muito baixa, ou esporolando. O período de tempo destes ciclos pode ser curto e medido em horas. Todas as células que crescem em ambientes aquosos, devido à elevada capacidade térmica mássica da água, resistem a alterações rápidas da temperatura. Em estudos termodinâmicos, pode-se garantir que a temperatura de crescimento microbiano permanece constante durante um ciclo de crescimento a pressão constante (83).

Um dos principais desafios enfrentados pelos organismos unicelulares é o seu ambiente externo não ser estável, mas pelo contrário, o seu ambiente interno garantir a estabilidade necessária para salvaguardar um crescimento o mais ordenado possível. Alterações drásticas nas condições de crescimento têm a capacidade de romper o ambiente celular interno, afetando funções críticas da célula e deste modo evitando o crescimento normal (84).

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo cujas respostas ao potencial de destruição resultante de alterações ambientais levam à atenuação ou inibição total do crescimento, com perda de capacidade interna de reparação dos materiais celulares e de retorno a condições de crescimento adequadas. Por outro lado, bloqueiam ainda a tradução de proteínas ribossomais, de enzimas envolvidos no metabolismo glucídico, de desintoxicação de ROS, no *fold*ing e degradação de proteínas que podem ser interpretadas como uma resposta direta ao *stress* expressa em diminuição de taxa específica de crescimento (84).

A literatura revela que o nível de ROS intracelular aumenta com a temperatura, podendo em situações de choque térmico ser interpretado como equivalente a condições de indução de *stress* oxidativo (85), onde a sobreposição de choque térmico com outro agente de *stress* como metais de transição pode despoletar respostas pró e antioxidantes que contribuam para a morte celular ou alternativamente para a termotolerância (62). Estes factos, foram confirmados em estudos onde se observou que *S. cerevisiae* mutantes, privadas de enzimas antioxidantes como catalases, superóxido dismutases (SOD) e citocromo c peroxidases, mostravam maior sensibilidade à temperatura (50 °C) do que células onde ocorria a sobreexpressão de catalases e SOD as quais exibem maior termoproteção (86) (87). Alguns autores descrevem ainda diversos estudos que revelam semelhanças entre o metabolismo energético de leveduras Crabtree positivas e o de células tumorais, como a repressão do metabolismo oxidativo induzida pela glicose, mesmo na presença do O₂, fenómeno vulgarmente designado por "glicólise aeróbia", comum aos dois tipos de células (31). Deste modo, a *S. cerevisiae*, um microrganismo Crabtree positivo (18) constitui um modelo metabólico de excelência para o rastreio de drogas utilizadas em terapias anti-tumorais (33) (38). Esta abordagem é possível porque se observou um aumento das atividades enzimáticas glicolíticas hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase em leveduras onde o metabolismo fermentativo foi induzido pela adição de glicose (33) (88). O aumento da atividade fosfofrutocinase parece dever-se apenas ao aumento da disponibilidade intracelular do seu ativador alostéreo, frutose 2,6-difosfato, não sendo mencionadas alterações nos níveis de expressão. Outro factor que suporta a utilização de *S. cerevisiae* como modelo biológico, no rastreio de drogas antitumorais, prende-se com a semelhança entre leveduras fermentativas aeróbias e células tumorais, no que diz respeito à regulação dos níveis de piruvato intracelular, uma vez que a sua utilização pelo ciclo do citrato parece ser limitada pelo abrandamento da sua oxidação em células com metabolismo citoplasmático fortemente ativo (89) (90) (91). Além do exposto foi descoberto que os genes que codificam os enzimas piruvato desidrogenase, cinases e respetivas fosfatases de mamíferos apresentam elevada homologia sequencial com genes de leveduras. O passo de fosforilação do piruvato desidrogenase é particularmente importante uma vez que modula a sua atividade catalítica, tanto em leveduras como em mamíferos, sendo a sua forma desfosforilada detetada em células onde ocorra preferencialmente o metabolismo oxidativo (92). Embora o destino do piruvato citoplasmático, em

leveduras, não siga maioritariamente o destino detetado em células tumorais, este intermediário continua a fazer parte de uma encruzilhada metabólica relevante, uma vez que o desvio do fluxo de carbono para a via fermentativa está usualmente associado ao bloqueio da disponibilidade de substrato para a via oxidativa, traduzindo-se num aumento preferencial da actividade piruvato descarboxilase (PDC) de leveduras fermentativas ou da actividade lactato desidrogenase (LDH) de células cancerígenas. Assim, a redução do piruvato citoplasmático a acetaldeído mediada pelo enzima piruvato descarboxilase, seguido pela formação de etanol, acoplada à reoxidação do NADH citoplasmático, via álcool desidrogenase (ADH) constitui em *S. cerevisiae* um ponto relevante de comparação metabólica com células tumorais que neste caso se manifesta preferencialmente por um aumento da fermentação láctica via lactato desidrogenase (33) (93) (94). Contudo, a redução do piruvato citoplasmático a lactato, via lactato desidrogenase também pode ocorrer em *S. cerevisiae*, constituindo um passo enzimático adicional que permite estabelecer o paralelismo metabólico entre células cancerígenas e células de levedura (95). Convém ainda referir que à semelhança do que foi descrito para células tumorais, também se observou em *S. cerevisiae* fermentativas aeróbias um abrandamento do ciclo do citrato, ao nível das actividades catalíticas aconitase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase, bem como das actividades succinato desidrogenase e citocromo c oxidase dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial (96). Características metabólicas adicionais exibidas por células tumorais, como limitações nos níveis intracelulares de ADP e de Pi, decréscimo da capacidade respiratória induzida por iões Ca^{2+} e decréscimo da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, inibição da cadeia respiratória mediada pela frutose-1,6-difosfato foram igualmente detetadas em leveduras fermentativas aeróbias (97) (93). Para além do que tem vindo a ser descrito, a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* em estudos de crescimento, senescência e morte celular, bem como de resposta ao *stress*, ou de caracterização de falhas em vias de sinalização celular, associadas a doenças degenerativas de eucariontes multicelulares e evolutivamente distantes, têm sido frequentemente descritas na literatura, onde este microrganismo é amplamente recomendado como modelo biológico (98) (99) (100) (101) (102) (103).

Os primeiros estudos de senescência celular em que foram utilizadas *S. cerevisiae*, ocorreram há mais de 50 anos, e mostraram que as leveduras possuíam capacidade replicativa finita (104). Estudos recentes sugerem que poderá existir relação

entre a apoptose e a senescência celular em leveduras (74). A literatura revela também que diversos fenómenos que decorrem durante a apoptose de *S. cerevisiae*, nomeadamente mutações no gene *cdc48* e sobreexpressão do gene *bax*, são comuns a outros sistemas celulares que se encontram na mesma situação. Ao nível do envelhecimento celular e *stress* oxidativo, outros estudos revelaram que neste organismo as ROS acumulam-se durante o desvio diaúxico e fase estacionária do crescimento destes microrganismos, quando alteram o seu metabolismo de respiratório-fermentativo para respiratório (105) (106) (107).

Todavia, não se encontrou descrito na literatura qualquer estudo que correlacione respostas do metabolismo energético e do metabolismo antioxidante de *S. cerevisiae* ao contacto com nanopartículas de metais de transição com diferentes dimensões moleculares, em condições de choque térmico, aspetos inovadores do estudo aqui proposto.

A *S. cerevisiae* UE-ME₃ é uma estirpe vínica nativa do Alentejo, Portugal que possui propriedades fisiológicas específicas e únicas que lhe facilitam a sobrevivência em ambientes extremos, como os dos mostos onde ocorrem níveis elevados de glúcidos (140-160 g/L) e de álcool (superior a 15 % (v/v)), pH ácido (3,0 - 3,5) e baixo teor em nitrogénio, lípidos e vitaminas (108) (109). A estirpe UE-ME₃ é desde há alguns anos utilizada no Laboratório de Bioquímica Analítica da Universidade de Évora, em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias, triazinas e metais de transição (110) (111).

1.4. Metabolismo energético

1.4.1. Compartimentação celular e metabolismo do NADH

Tal como em outras células eucariontes, o metabolismo de *S. cerevisiae* não pode ser compreendido sem ter em conta fenómenos de compartimentação metabólica. Os microcorpos que incluem os peroxissomas e os glioxissomas, desempenham um papel importante durante o crescimento de *S. cerevisiae* em fontes de carbono não fermentáveis (112). No entanto, neste contexto focar-se-á preferencialmente no papel do citoplasma e dos mitocondrios. A membrana interna mitocondrial é virtualmente impermeável a coenzimas nucleotidopiridínicos. Consequentemente o equilíbrio redox dita quais os coenzimas reduzidos que devem ser reoxidados nos compartimentos onde são gerados. Contrastando com o *turnover* do NADPH, que ocorre predominantemente no citoplasma (113) (114), o *turnover* do NADH ocorre a taxas elevadas tanto no

citoplasma como na matriz mitocondrial. Por exemplo, durante o crescimento respiratório em presença de glúcidos, o NADH é gerado no citoplasma pela glicólise, assim como na matriz mitocondrial pelo ciclo do citrato. O mecanismo que acopla a oxidação do NADH nestes dois compartimentos com a cadeia respiratória será discutido posteriormente. A taxa relativamente baixa do *turnover* do NADH no citoplasma e matriz mitocondrial depende fortemente da fonte de carbono. Por exemplo, a dissimilação do lactato pela *S. cerevisiae*, iniciada pela oxidação do lactato em piruvato, via lactato desidrogenase, não gera NADH citoplasmático (95) (115). Contudo no crescimento em presença de etanol, a situação é ambígua. A *S. cerevisiae* contém pelo menos duas álcool desidrogenases citoplasmáticas e pelo menos um isoenzima mitocondrial (116) (117). Embora se acredite que apenas um dos enzimas álcool desidrogenase citoplasmáticos, *adh2p* seja responsável pela dissimilação do etanol (117), foi observado que mutantes com deleção prototrófica, possuem atividade álcool desidrogenase reduzida e exibem em etanol um máximo de taxa específica de crescimento específica 30% inferior à correspondente estirpe nativa CEN.PK 113-7D. Isto sugere que o crescimento em etanol pode envolver a oxidação do etanol em aldeído em dois compartimentos diferentes. A assimilação de glicose em biomassa envolve a redução líquida do NAD⁺ em NADH. Esta produção assimilatória de NADH está sujeita a compartimentação metabólica. Baseado na composição da bioamassa de *S. cerevisiae*, tem sido estimado que cerca de 60-80% do NADH formado pela degradação da glicose está acoplado a reações biossintéticas de aminoácidos (113) (114). Embora a localização dos enzimas não seja conhecida em todos os casos, cálculos grosseiros mostraram que 30-50% do NADH produzido na síntese de aminoácidos, é gerada pela matriz mitocondrial (113). Nissen e colaboradores realizaram uma análise de fluxo quantitativa para o crescimento anaeróbico de *S. cerevisiae* e demonstraram que grande parte do NADH mitocondrial derivava da síntese de α -cetogluturato, o precursor do aminoácido glutamato (118). A síntese de outros aminoácidos a partir do glutamato ou de outros precursores contribuíam em menor extensão para a produção de NADH mitocondrial, enquanto que na síntese de DNA e RNA, apenas estão envolvidos os coenzima NADH e NADPH citoplasmáticos. Uma vez que os enzimas que participam na formação de glicerol são exclusivamente citoplasmáticos, a reoxidação anaeróbia do NADH mitocondrial requer um mecanismo de transporte que exporte equivalentes redutores para o citoplasma (118).

1.4.2. Cadeia respiratória em *Saccharomyces cerevisiae*

No crescimento respiratório, tanto o NADH citoplasmático como mitocondrial é reoxidado pela cadeia respiratória. O NADH gerado na matriz mitocondrial pode ser oxidado por uma NADH:ubiquinona oxidorreductase, também denominada por NADH desidrogenase interna. Em contraste com o clássico complexo tipo I NADH desidrogenase, a NADH desidrogenase interna de *S. cerevisiae* não é inibida pela rotenona nem está acoplada à geração de força protomotriz (119). Este facto contribui para a baixa estequiometria do ATP da fosforilação oxidativa em *S. cerevisiae*. Tal como os mitocondrios das plantas, mas diferente dos mitocondrios de mamíferos, os mitocondrios de levedura oxidam o NADH citoplasmático directamente (120). O enzima responsável por esta reacção é uma NADH:ubiquinona oxidorreductase, referida usualmente como NADH desidrogenase externa. Tal como a desidrogenase interna, está localizada na membrana interna mitocondrial, mas com o seu centro ativo virado para o espaço intermembranar, é insensível à rotenona e não bombeia protões (119). Alternativamente, o NADH citoplasmático pode ser oxidado pela cadeia respiratória pelo mecanismo de transporte de glicerol-3-fosfato que consiste numa glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada ao NADH e uma glicero-3-fosfato:ubiquinona oxidorreductase ligada à membrana (121) (122). Todas as vias respiratórias de oxidação do NADH convergem para a *pool* de ubiquinona. A ubiquinona doa os seus electrões ao citocromo *c* via complexo *bc1*. A oxidação terminal do citocromo *c* é catalisada pelo citocromo *c* oxidase. A ocorrência do transporte de NADH através da membrana interna mitocondrial, bem como o eventual mecanismo que lhe esteja associado ainda não se encontra totalmente esclarecido em *S. cerevisiae*, este assunto voltará a ser discutido neste texto (119).

A cadeia respiratória de *S. cerevisiae* difere da de outros fungos e plantas em alguns aspetos. Embora pareça existir alguma divergência quanto à oxidação do NADH em *S. cerevisiae* não ser sensível à rotenona, a não funcionalidade do complexo I nesta levedura constitui um facto comprovado uma vez que os genes codificantes das subunidades deste complexo multienzimático não se encontram presentes no seu genoma (123). Além disso, as plantas, os fungos filamentosos, diversas leveduras e alguns parasitas contêm oxidases alternativas insensíveis ao cianeto que catalisam a oxidação direta da ubiquinona pelo dioxigénio sem gerar força protomotriz (124). Contudo, oxidases alternativas estão ausentes em *S. cerevisiae*, uma vez que o seu

genoma não contém genes para esse tipo de oxidases. Também têm sido detetadas diferenças metabólicas entre estirpes de *S. cerevisiae* no que diz respeito à importância de vias múltiplas de oxidação do NADH para a taxa máxima da degradação oxidativa da glicose (125).

1.4.3. Fosfatase alcalina e biodisponibilização de fosfato

O termo fosfatase alcalina designa uma ampla família de isoenzimas cuja expressão depende da espécie e das condições fisiológicas a que um determinado indivíduo se encontra sujeito. Os enzimas ALP reconhecem como substratos moléculas que possuem um grupo fosfato (Pi) em posição terminal que é libertado para o meio de reação durante o percurso reacional, atuando como fosfotransferases a pH alcalino, de acordo com a equação:



Apesar de não ter sido ainda identificado um substrato natural para estes enzimas, a literatura atribui-lhes um papel relevante na manutenção da homeostase do fosfato inorgânico (Pi), na síntese e degradação de polifosfatos, surgindo muitas vezes associado, a processos como proliferação, diferenciação, sinalização, migração e defesa celular, meiose, mitose, apoptose ou ainda na modulação do metabolismo dos ácidos nucleicos (126) (127) (128).

Este enzima dimérico possui no seu centro ativo dois iões zinco que se encontram envolvidos no processo de catálise, bem como um ião magnésio que intervém na estabilização estrutural do centro catalítico (129). Os catiões metálicos divalentes são necessários para assegurar a atividade fosfatase alcalina, enquanto que agentes quelantes como o EDTA exercem um efeito inibitório (126) (130) (129). O enzima possui dois centros catalíticos que funcionam em alternância. Outros elementos de transição como o Mn, Co, Ni, Cu, Cd e Hg são capazes de ligar-se ao apoenzima estável. Contudo, apenas o Co^{2+} consegue reativar a atividade catalítica após substituição do Zn^{2+} (131).

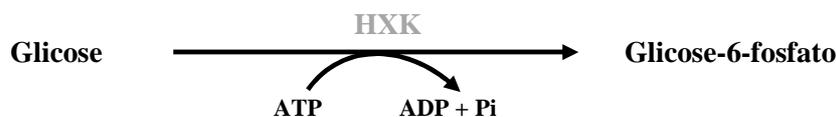
Em *S. cerevisiae*, os enzimas ALP são codificados por dois genes estruturais: *pho8* e *pho13*, ambos localizados no cromossoma IV. O produto *PHO8* ALP é uma proteína dimérica dependente de $\text{Mg}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, idêntica à detetada em células de

mamíferos (132) (133). Essa proteína encontra-se localizada no vacúolo celular exibindo baixa especificidade para o substrato. Alguns autores relatam ainda que a actividade deste isoenzima pode ser bloqueada quando o nível de Pi do meio é elevado, funcionando este como inibidor competitivo. Contudo mesmo nessas condições o nível de actividade catalítica residual permanece superior ao expectável. O produto do gene *pho13* é uma proteína monomérica com elevada especificidade para o p-nitrofenilfosfato (p-NPP). Tal como o produto do gene *pho8*, a actividade catalítica desta proteína é fortemente influenciada pelo catião divalente Mg^{2+} . No entanto a sua expressão não é perturbada pela presença de Pi do meio (132) (134) (135).

1.4.4. Alguns enzimas envolvidos no efeito Crabtree

Hexocinase (HXK)

O enzima hexocinase, ATP-D-hexose-6-fosfotransferase, catalisa o primeiro passo regulador da via glicolítica (Figura 1.1) com transferência de um grupo fosfato do ATP para hexoses como a D-glicose, a D-manose e a D-frutose de acordo com:

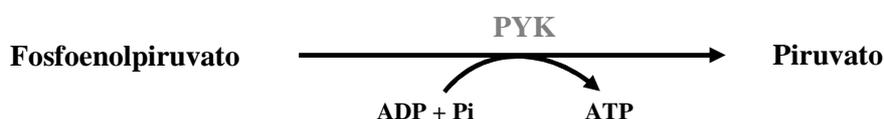


O fluxo de carbono após este passo de investimento energético, onde a glicose é convertida em glicose-6-fosfato, pode seguir pela via glicolítica, com isomerização deste intermediário em frutose-6-fosfato, mediada pelo enzima glicose-6-fosfato isomerase; ou derivar pela via das pentoses fosfato (PP), cujo primeiro passo, catalisado pelo enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, participa na conversão da glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconolactona com formação de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, necessários à biossíntese de lípidos ou à resposta antioxidante, ribose-5-fosfato um precursor da biossíntese de nucleótidos, bem como ATP se acoplada à produção de equivalentes redutores (Figura 1.1). O enzima hexocinase é uma proteína alostérea de grande dimensão que manifesta comportamento cooperativo entre duas subunidades assimetricamente unidas. Cada subunidade proteica encontra-se organizada em dois lóbulos separados por uma cavidade profunda, o local de ligação ao glícido. O ATP pode ligar-se de forma cooperativa entre as duas metades do dímero e próximo de uma das moléculas glicídicas (136) (129) (137) (138). O enzima hexocinase de

localização citoplasmática, pode apresentar-se em duas isoformas quimicamente distintas: HXKI e HXKII. A forma HXKII é ativada por níveis baixos de fosfato inorgânico, citrato, malato, gliceraldeído-3-fosfato e ATP a pH inferior a 7,0, e inibida por níveis baixos de ADP e GDP (0,2-0,5 mM) se o pH da reação for estabilizado por soluções tampão sulfonadas. A literatura descreve esta isoforma como a principal responsável pela repressão pela glicose em *Saccharomyces cerevisiae* (139) (140).

Piruvato cinase (PYK)

O enzima piruvato cinase catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato acoplada à fosforilação do ADP em ATP, outro passo irreversível da via glicolítica (Figura 1.1):

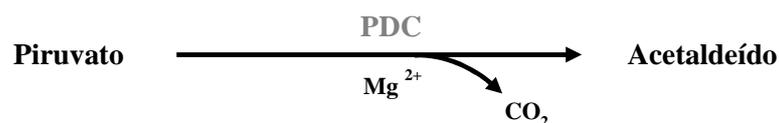


Do ponto de vista estrutural é descrito como um homotetrâmero com subunidades de 50-60 kDa organizadas em quatro domínios: *N*-terminal, A, B e C. O centro ativo encontra-se localizado entre os domínios A e B a cerca de 39 Å do centro de ligação ao efetor que se encontra localizado no domínio C. No tetrâmero, os domínios C adjacentes formam uma interface C-C, designada por "pequena interface", enquanto que os domínios A estabelecem interfaces A-A, designadas por "grandes interfaces". O domínio B funciona como um obturador móvel que modula o acesso ao centro ativo. Este domínio estabelece ainda ligações ao oxalato, ATP, Mg²⁺ e K⁺. Como enzima regulador do *out flow* da via glicolítica, sofre modulação alostérica por efetores positivos como a frutose 1,6- difosfato e efetores negativos como o ATP, citrato, acetil-CoA, ácidos gordos de cadeia longa e alanina (141) (142) (143). Os genes que codificam o enzima piruvato cinase em *S. cerevisiae*, *pyk1* e *pyk2*, expressam-se constitutivamente como os de outros enzimas glicolíticos, sendo a sua expressão modulada pela presença de glicose no meio (144). A sequência nucleotídica responsável pela repressão da transcrição do gene *pyk* quando as células de levedura são cultivadas em fontes de carbono não fermentáveis já foi identificada e uma deleção nessa região do gene *pyk1* bloqueia o crescimento quando as leveduras utilizam glicose ou outros glúcidos fermentáveis como única fonte de carbono. No entanto, quando é

disponibilizado etanol ou lactato como fonte de carbono exclusiva, as leveduras seguem o seu perfil de crescimento. Tal facto sugere que existe uma via alternativa para a síntese de piruvato que eventualmente envolverá malato desidrogenase. O isoenzima PYK1 encontra-se também envolvido no ciclo celular, sendo inibido pela temperatura quando esta excede os 36 °C e ativado por glicose e frutose-1,6-difosfato (FBP) (90). O isoenzima codificado pelo gene *pyk2* responde à repressão catabólica pela glicose sendo insensível à presença de FBP. Pode por esse motivo permanecer ativo quando os níveis celulares de FBP são insuficientes para ativar a isoforma codificada pelo gene *pyk1* (145). Deste modo, a isoforma codificada pelo gene *pyk1* pode ser considerada como o principal piruvato cinase da via glicolítica (90) (145).

Piruvato descarboxilase (PDC)

O enzima piruvato descarboxilase catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetaldeído utilizando magnésio como cofator, de acordo com a equação:



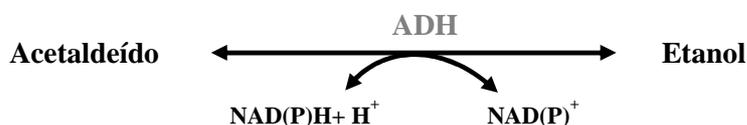
Em *S. cerevisiae*, o enzima de localização citoplasmática (Figura 1.1) apresenta-se sob a forma de um homotetrâmero com subunidades com a dimensão molecular de 62 kDa e manifesta cinética cooperativa para o piruvato, efeito acentuado pela presença de fosfato quando o seu nível intracelular varia entre 5 e 15 mM. Todavia, o fosfato inorgânico pode comportar-se como inibidor competitivo quando o nível de exposição do enzima é igual ou superior a 25 mM (146) (147) (148).

O enzima piruvato descarboxilase pode ser codificado por três genes estruturais: *pdc1*, *pdc5* e *pdc6*. O gene *pdc1* foi isolado por complementação de mutantes de *S. cerevisiae* com baixa atividade piruvato descarboxilase, obtidos por tratamento com etil-metil sulfonato. No entanto, mutantes onde o gene *pdc1* foi silenciado manifestavam níveis elevados desta atividade catalítica. Tal facto levou à descoberta do gene homólogo *pdc5* e permitiu inferir que a expressão dos genes *pdc* está sujeita a autorregulação. Um terceiro gene *pdc*, o *pdc6* foi isolado por testes de hibridação de uma biblioteca genómica com uma sonda desenvolvida para o gene *pdc1*. Embora a sequência do gene *pdc6* possua elevada semelhança sequencial com a dos genes *pdc1* e *pdc5*, a sua rutura não provoca alterações significativas na atividade piruvato

descarboxilase. Estudos realizados com *S. cerevisiae* sugerem que a atividade PDC é modulada pelos níveis intracelulares de diversos derivados metabólicos gerados pela glicólise. Deste modo, alterações na fonte de carbono disponível no meio de cultura podem afetar bruscamente parâmetros como viabilidade celular, pH ou a concentração de dióxigénio (5) (149).

Álcool desidrogenase (ADH)

O termo álcool desidrogenase designa um grupo de enzimas de ocorrência ubíqua que participam na interconversão de álcoois em aldeídos ou cetonas, processo que se dá acoplado à redução do dinucleótido de adenina e nicotinamida:



Em leveduras, os enzimas álcool desidrogenase, codificados pelos genes *adh1*, *3*, *4* e *5* desempenham um papel relevante na fermentação do piruvato gerado pela glicólise, após a sua conversão pela PDC em acetaldeído, o substrato que reduzem a etanol (Figura 1.1). Em termos metabólicos, o seu papel biológico é por vezes entendido como um processo de reciclagem do coenzima NAD^+ , via fermentação alcoólica, um processo explorado pelo homem para produzir bebidas a partir de frutos ou grãos de cereais e pão. Por vezes, o etanol é convertido em acetaldeído pela *adh2*, produto que após conversão em acetato pelo enzima aldeído desidrogenase segue o percurso metabólico que envolve o ciclo do citrato com libertação de CO_2 como produto final da reação (Figura 1.1). Os enzimas álcool desidrogenase de levedura possuem um tamanho molecular superior ao dos enzimas humanos, encontrando-se estruturalmente organizados em quatro subunidades. O seu centro ativo inclui o metal de transição zinco. Um isoenzima ADH de *S. cerevisiae* foi purificado pela primeira vez por Negelein em 1937 (150). De acordo com Pfam e a base de dados COG (151) (152) (153), o genoma de *S. cerevisiae* codifica cerca de doze isoenzimas ADH, nos quais estão incluídos ADH1, ADH2, ADH3, ADH5, ADH6, onde o zinco se encontra ligado ao *motif* GHEX2GX5(G,A)X2(I,V,A,C,S) (153).

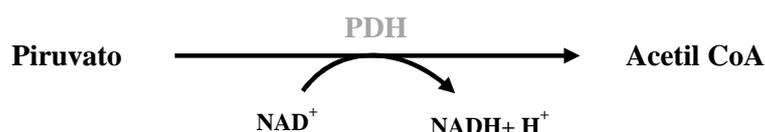
A atividade ADH é finamente regulada pela disponibilidade de glicose no meio de cultura. Assim quatro dos cinco isoenzimas ADH maioritariamente detetados em *S.*

O enzima lactato desidrogenase localizado maioritariamente no espaço intermembranar mitocondrial (DLD1), encontra-se parcialmente embebido na membrana mitocondrial. Em levedura, este flavo-hemo-enzima pode assumir também a designação de citocromo b2 (26) (155) (95) (156).

A produção de lactato por *S. cerevisiae* vínicas é muito baixa. Por esse motivo, a restrição catabólica do metabolismo respiratório nesta espécie de levedura induz preferencialmente um aumento da expressão funcional dos enzimas que participam na fermentação alcoólica. (157) (5) (158).

Piruvato desidrogenase (PDH)

O complexo multienzimático piruvato desidrogenase ($M_r = 8-9 \times 10^6$), pertence à família de complexos α -oxoácidos desidrogenase que catalisam a descarboxilação oxidativa de α -oxoácidos utilizando a lipoamida como coenzima:



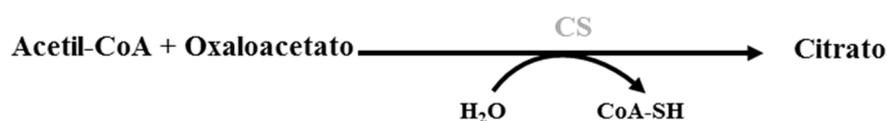
Este complexo exhibe três atividades catalíticas distribuídas por três tipos de subunidades independentes, usualmente designadas por E1 (piruvato desidrogenase), E2 (lipoato aciltransferase) e E3 (lipoamida desidrogenase).

Em *S. cerevisiae*, as subunidades E1 e E2 são exclusivas do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase enquanto que a subunidade E3 é partilhada pelo complexo α -cetoglutarato desidrogenase e complexo piruvato desidrogenase. A atividade catalítica E1 em microrganismos como a *S. cerevisiae*, é assegurada por duas subunidades E1 α e E1 β ; o grupo α -hidroxilo do aldeído ativo ligado à subunidade α é oxidado e o grupo acetilo resultante pode acoplar-se ao cofator lipoamida na subunidade E2, com a subsequente ligação ao CoA. A conversão do piruvato em acetil-CoA é pois catalisada pela ação concertada das quatro subunidades (Figura 1.1). No primeiro passo, o piruvato liga-se covalentemente ao pirofosfato de tiamina (TPP), o cofator da subunidade E1. Esta reação gera 2- α -hidroxietil-TPP, um aldeído ativo, cuja oxidação catalisada pela subunidade E3 dá-se acoplada à redução da lipoamida, ligada à subunidade E2, a dihidrolipoamida, que utiliza o coenzima NAD^+ como aceitador de eletrões. A atividade do complexo piruvato desidrogenase é difícil de quantificar em extratos celulares em

bruto devido à degradação proteolítica e à interação com outras enzimas como a piruvato descarboxilase. Estudos realizados com frações mitocondriais sugerem que o complexo piruvato desidrogenase expressa-se tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas utilizando etanol como fonte de carbono, um indício forte do papel do complexo piruvato desidrogenase em processos assimiladores mitocondriais que exigem aldeídos ativos ou acetil-CoA (5) (159).

Citrato sintase (CS)

O enzima citrato sintase, catalisa a formação de citrato a partir de acetil-CoA e oxaloacetato, o primeiro passo do ciclo do citrato (TCA) (Figura 1.1):



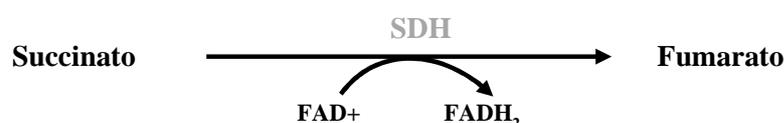
Trata-se de uma transferase com localização na matriz mitocondrial, codificada pelo DNA nuclear, traduzida no citoplasma e posteriormente transportada para a matriz mitocondrial. Este enzima é vulgarmente utilizado como marcador quantitativo da funcionalidade dos mitocondrios. O enzima catalisa a formação de citrato, uma estrutura com seis átomos de carbono a partir de dois precursores, o acetil-coA e o oxaloacetato com dois e quatro átomos de carbono respetivamente. A reação constitui um dos passos reguladores do ciclo do citrato. O enzima sofre inibição alostérea por níveis intracelulares elevados da razão ATP/ADP e $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$, resposta que revela o papel relevante que desempenha na disponibilização de energia para a célula. O enzima pode ainda ser inibido pelo citrato e pelo succinil-CoA, exemplos de inibição retroativa pelo produto (160) (161).

Enquanto membro do ciclo do citrato, participa numa via oxidativa terminal para onde converge a quase totalidade das vias degradativas de nutrientes, onde o acetil-CoA é totalmente oxidado a CO_2 e H_2O , ao longo de quatro etapas que levam à formação de 3 moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ e 1 molécula de FADH_2 por cada volta do ciclo, posteriormente oxidados pela cadeia respiratória com formação acoplada de ATP (Figura 1.1). Ao nível do passo reacional que envolve a atividade enzimática succinil-CoA sintetase ocorre ainda a formação de GTP, um intermediário que dispõe de uma ligação monofosfoéster com potencial químico elevado. Por fim, o oxaloacetato,

intermediário aceitador de acetato, é regenerado no último passo do ciclo (Figura 1.1) (161).

Succinato desidrogenase (SDH)

O termo succinato desidrogenase ou complexo II, designa um enzima dimérico com localização na membrana interna mitocondrial que intervêm no ciclo do citrato e na cadeia respiratória, catalisando a oxidação do succinato a fumarato, acoplada à redução do coenzima FAD^+ a $FADH_2$, de acordo com a equação (162) (Figura 1.1):

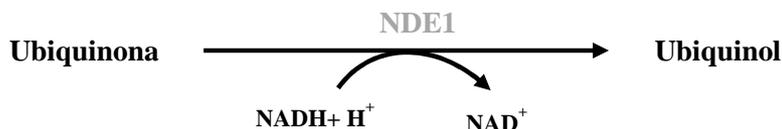


Do ponto de vista estrutural possui duas subunidades, com peso molecular 30 e 70 kDa. Como a subunidade maior contém um núcleo flavínico fortemente envolvido no processo redox descrito anteriormente, o enzima pode ser descrito como uma flavoproteína. Por outro lado, como ambas as subunidades possuem centros de ferro e enxofre, pode ainda ser incluído no grupo das ferro-sulfo-proteínas. Curiosamente, o coenzima $FADH_2$ gerado pela oxidação do succinato não se dissocia do enzima, como acontece com o $NADH$ gerado em outras reações de oxidação-redução. Tal facto leva a que o grupo prostético só possa ser reoxidado *in situ*. Assim, a forma reduzida do grupo prostético transfere os seus equivalentes redutores para a ubiquinona ou coenzima Q que se reduz a ubiquinol (QH_2). Este liberta-se então do enzima, difundindo pela bicamada lipídica até alcançar o citocromo bc1 ou complexo III, o aceitador seguinte da cadeia respiratória que assegura mais uma etapa do fluxo de eletrões até ao aceitador final, o dióxigénio (Figura 1.1) (162).

O ciclo do citrato progride em simultâneo com a hidratação do fumarato a malato, catalisada pelo enzima fumarase, seguida pela oxidação do malato a oxaloacetato, acoplada à redução do NAD^+ a $NADH + H^+$, pelo enzima malato desidrogenase (MAE1, MDH1, MDH3) (Figura 1.1) (163).

NADH (ubiquinona) desidrogenase I (NDHI)

O termo NADH (ubiquinona) desidrogenase, também referido por coenzima Q redutase, complexo I desidrogenase, ou NADH-Coenzima Q redutase designa, em geral, um conjunto de enzimas que catalisam a reação (Figura 1.1) (111):



Contudo, em *S. cerevisiae* não existe o complexo I, contrariamente ao que acontece em mitocôndrios de outros eucariontes, expressando-se em alternativa três enzimas NADH desidrogenases insensíveis à rotenona, NDI1, NDE1 e NDE2, localizados na membrana interna mitocondrial que não se comportam como transportadores transmembranares de iões H₃O⁺ (111) (164).

O NADH gerado na matriz mitocondrial, ao nível do complexo multienzimático piruvato desidrogenase e dos enzimas isocitrato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e malato desidrogenase do ciclo do citrato, pode assim ser oxidado pelo enzima NADH (ubiquinona) desidrogenase interno (NDI1) que tem sido apontado como um regulador importante do ambiente redutor mitocondrial criado pelo NADH proveniente do ciclo do citrato e da oxidação do etanol pelo desvio metabólico acetaldeído/etanol (93). Os mitocôndrios das leveduras, tal como os mitocôndrios das células vegetais, oxidam diretamente o NADH citoplasmático. As duas atividades NADH desidrogenases externas (NDE1 e NDE2) encontram-se localizadas na membrana interna mitocondrial, mas com os seus centros ativos expostos ao espaço intermembranar. Como a membrana externa é permeável ao NADH (164) (165) e a membrana interna pelo contrário é impermeável ao coenzima reduzido, alguns autores tem atribuído a estas enzimas o papel de oxidar o NADH citoplasmático proveniente da glicólise, o qual pode também ser oxidado pela cadeia respiratória, via glicerol-3-fostato desidrogenase (38). Deste modo, os mitocôndrios de leveduras, ao contrário dos mitocôndrios de mamíferos, são capazes de oxidar diretamente o NADH citoplasmático sem se associarem ao transporte de prótons (Figura 1.3) (164) (166) (167).

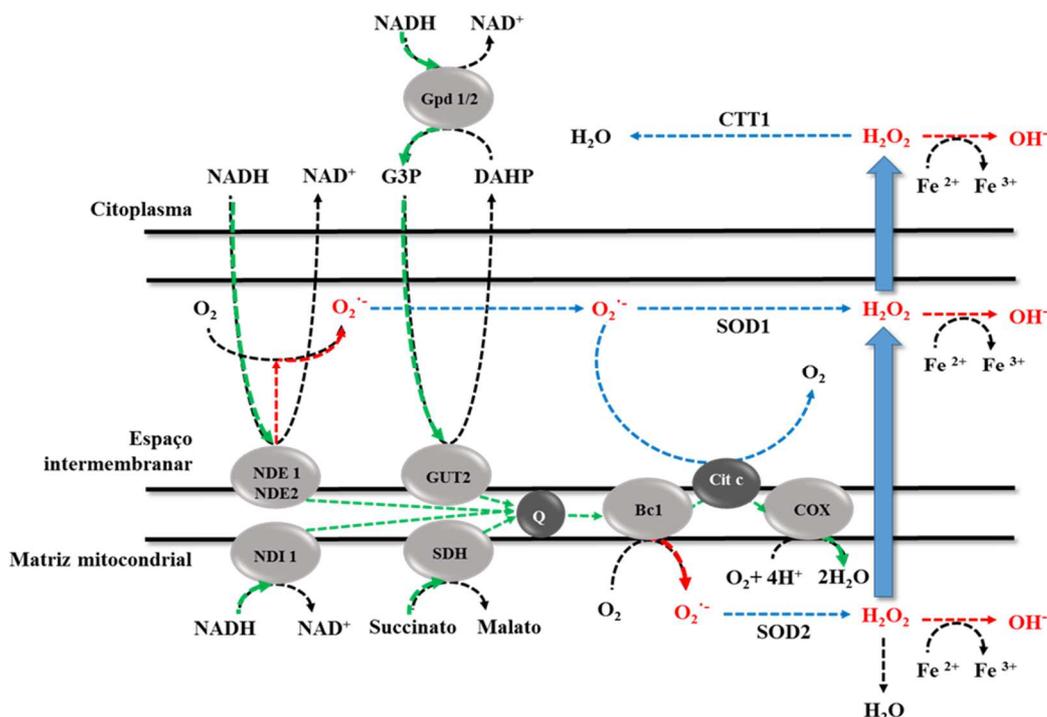


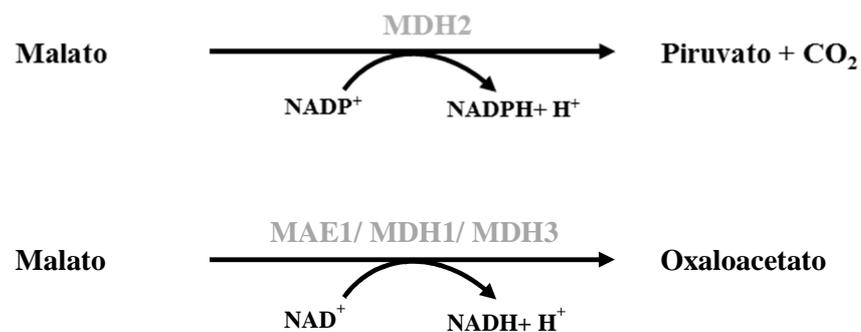
Figura 1.3 Representação esquemática da cadeia respiratória de *S. cerevisiae*. A vermelho estão assinalados locais de formação de ROS e a azul interações metabólicas com proteínas antioxidativas; BC1, Cit C, COX, CTT 1, GDP, GPX, GR GUT2, NDE1, NDE2, NDI1, PRX, Q, SDH, SOD (adaptado de (167)).

Como descrito anteriormente, o complexo succinato desidrogenase participa na transferência de equivalentes redutores sob a forma de FADH₂ do succinato, gerado pelo ciclo do citrato, para a ubiquinona ou coenzima Q na cadeia respiratória. Deste modo, a oxidação mitocondrial dos coenzimas NADH e FADH₂ em *S. cerevisiae* converge para a ubiquinona que transfere os electrões ao citocromo c via complexo III. A oxidação do citocromo c com transferência de equivalentes redutores para o dióxigénio é posteriormente mediada pelo citocromo c oxidase, COX, ou complexo IV (167) (Figura 1.3). Do ponto de vista estrutural, os enzimas NADH desidrogenase de leveduras são muito mais simples do que o complexo I de mamíferos, constituídos por 46 subunidades, onde sete das quais são codificadas pelo genoma mitocondrial (168). Por exemplo, o enzima NDE1 possui uma subunidade simples de 53 kDa ligada covalentemente ao dinucleótido FAD, codificada pelo DNA nuclear. Essa subunidade é sintetizada pelos ribossomas citoplasmáticos e importada para o mitocondrio. O núcleo flavínico e os centros de ferro e enxofre constituem os seus principais cofatores. Estas desidrogenases diferem do complexo I de mamíferos, pela insensibilidade à rotenona e pela ausência de centros redox de ferro-enxofre como referido anteriormente (167) (93)

(169) (170). A presença de NADH desidrogenases externas em leveduras poderá ser correlacionada com a indetetibilidade do transportador malato-aspartato especulada por alguns investigadores, um dos mais importantes dos mitocondrios de mamíferos. Contudo, existem sistemas alternativos detetados em *S. cerevisiae*, como o glicerol-3-fosfato desidrogenase e transportadores etanol-aldeído (93) (116) (164) (165).

Malato desidrogenase (MDH1, MDH2, MDH3 e MAE1)

O termo malato desidrogenase designa um conjunto de enzimas que se encontram envolvidos em diferentes percursos metabólicos e ubiquamente distribuídos por seres procariontes e eucariontes que catalisam a descarboxilação oxidativa do L-malato em oxaloacetato ou piruvato, CO_2 e NAD(P)H , de acordo com a equação (171) (172) (173) (174):



Em *Saccharomyces cerevisiae* existem diferentes compartimentos celulares onde podem ser detetados isoenzimas distintos designados por malato desidrogenase (MDH1,2,3, EC 1.1.1.37 e MAE1, EC 1.1.1.38) que catalisam a interconvesão dependente de NAD(P)H do malato em oxaloacetato ou em piruvato (Figura 1.1). Os enzimas MDH1 e MAE1 mitocondriais que catalisam esse tipo de reação ao nível do ciclo do citrato parecem ser vitais para assegurar o crescimento de *S. cerevisiae* quando este metaboliza acetato como fonte de carbono (175) (176), uma vez que leveduras que não dispõem de genes funcionais codificantes da atividade MDH1, não crescem nessas condições de cultura (177). O piruvato gerado durante a utilização aeróbia da glicose é oxidativamente descarboxilado para gerar acetil-CoA que é totalmente oxidado a dióxido de carbono e água pelo ciclo do citrato. Como descrito anteriormente, este ciclo também disponibiliza intermediários para a biossíntese de aminoácidos, resíduos acilo, hemo e glicose via gliconeogénese. O isoenzima MDH1 faz ainda parte do mecanismo de transporte de equivalentes redutores sob a forma de NADH que regula a razão

NAD⁺/NADH no citoplasma e no mitocondrio. A membrana interna mitocondrial é impermeável ao NAD⁺ e NADH, mas alguns autores postulam que através do transportador malato-aspartato, o MDH1 e o AAT2 convertem o malato em oxaloacetato seguido da sua conversão em aspartato no interior do mitocondrio com redução do NAD⁺ a NADH. O aspartato pode então ser transportado para o citoplasma onde é reconvertido em oxaloacetato e posteriormente em malato pelo AAT2 e MDH2, regerando NAD⁺ a partir de NADH. O facto da sobreexpressão do isoenzima MDH1 expandir a esperança de vida replicativa, aliado às evidências genéticas, sugere que esta via de transporte, cuja existência ainda gera alguma controvérsia, pode desempenhar um papel relevante na extensão da esperança de vida mediada por restrição calórica. Consistente com esta proposta sabe-se que a expressão do isoenzima MDH1 é sobre regulada durante a restrição calórica. O isoenzima MDH1 pode ser detetado na matriz mitocondrial e associado a um complexo supra molecular mitocondrial que inclui NADH desidrogenases e outros enzimas do ciclo do citrato, organização estrutural que facilita a transferência de metabolitos entre enzimas. Os isoenzimas MDH2 citoplasmáticos, são gliconeogénicos indispensáveis ao crescimento de leveduras quando crescem em meio mínimo utilizando etanol, glicerol ou acetato como fonte de carbono (178), à semelhança do que acontece com o fosfoenolpiruvato carboxicinase (PCK1) (179) e frutose-1,6-difosfatase (FBP1), outros membros da via gliconeogénica (180). A literatura descreve ainda que a expressão génica destes enzimas sofre repressão catabólica pela glicose. Como referido anteriormente, os níveis do isoenzima MDH2 podem ser modulados ao nível da transcrição pela glicose, ou degradados quando glicose é adicionada ao meio de cultura de células que cresceram em carência deste glícido. Este processo pode seguir duas vias: a proteossomal que exerce a sua ação após pequenos períodos de crescimento na ausência de glicose e a vacuolar que ocorre após longos períodos de carência de glicose. O isoenzima MDH3 peroxissomal, tem sido proposto por diversos autores como aquele que catalisa o passo do ciclo do glioxilato que leva à formação de intermediários metabólicos com 4 átomos de carbono a partir de precursores com 2 átomos de carbono (181) (182) sendo indispensável ao crescimento de *S. cerevisiae* que metabolizam oleatos como fonte nutricional (183).

Do ponto de vista estrutural, quase todos os isoenzimas MDH de levedura são homodímeros que possuem subunidades com massa molecular idêntica, 33500 (MDH1), 40700 (MDH2) e 37200 (MDH3) exibindo sequência primária com níveis de

identidade situados entre os 43 e os 50%. Relativamente ao enzima MAE1 a literatura apenas lhe atribui o peso molecular de 74380, sendo omissa a sua organização estrutural. Algumas diferenças detetadas na estruturas destes isoenzimas incluem, uma sequência de 17-resíduos de aminoácidos codificante da transferência do isoenzima MDH1 para o mitocondrio, removida durante o processo de importação (175) ou uma sequência de sinal que inclui o tripéptido Ser-Lis-Leu na região C-terminal, imprescindível à importação do isoenzima MDH3 para o peroxissoma (183). Além do que já foi referido, o isoenzima MDH2 possui uma extensão peptídica de 12 resíduos de aminoácidos, na região N-terminal não detetada nos isoenzimas MDH1 e MDH3. Embora a remoção dessa extensão gere um enzima truncado designado por Δ nMDH2 não influencia a sua atividade catalítica e torna-o resistente à inativação catabólica induzida pela glicose. Estirpes mutantes que expressam o isoenzima Δ nMDH2, manifestam adaptação lenta à utilização da glicose como fonte de carbono (171) (184). Estudos *in vivo* revelaram ainda que enzimas Δ nMDH2 cataliticamente ativos não funcionam adequadamente na gliconeogénese (177). Devido às condições de equilíbrio desfavoráveis para a formação de oxaloacetato a partir do malato ($\Delta G_0' \cong +29288$ kJ/mol), tem sido proposto que interações físicas entre o enzima malato desidrogenase e o enzima que lhe sucede no mesmo percurso metabólico podem ser necessárias para assegurar a transferência direta do oxaloacetato (185), um intermediário que existe em níveis de concentração muito baixos na célula. Interações entre enzimas do ciclo do citrato, malato desidrogenase e citrato sintase, bem como entre MDH2, PCK1 e FBP1 descritas em leveduras e outros organismos constituem um bom suporte experimental a esse modelo (177). Como referido anteriormente, o piruvato, um intermediário chave na assimilação de glúcidos por *Saccharomyces cerevisiae* é também um precursor da síntese de aminoácidos como a alanina, leucina, isoleucina, e valina (5) (186). Em geral, este intermediário pode ser disponibilizado pelo último passo da via glicolítica, mediado pelo enzima piruvato cinase quando a levedura cresce na presença de glúcidos. No entanto, a literatura descreve ainda que o enzima piruvato cinase perde a função que desempenha na assimilação de glúcidos quando *S. cerevisiae* cresce na presença de acetato ou de alcoóis como o etanol ou o glicerol. Contudo, a formação de piruvato como precursor de aminoácidos continua a ser assegurada por duas vias alternativas: aquela que envolve a descarboxilação oxidativa do malato em piruvato onde participa o enzima malato desidrogenase (MDH2) e aquela que envolve o ciclo do glioxilato com

formação de fosfoenolpiruvato a partir do acetil-CoA e o enzima gliconeogénico fosfoenolpiruvato carboxicinase que disponibiliza o substrato para o piruvato cinase (174). Fiaux e colaboradores em 2003 revelaram que a síntese de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de pentoses não era detetável em *S. cerevisiae*, facto que sustenta a hipótese de o catabolismo da glicose decorrer quase exclusivamente pela via glicolítica (187). Apesar de não ter sido detetado catabolismo da glicose pela via das pentoses fosfato (PP) (187) em *S. cerevisiae* de cultura descontínua, estudos com marcação fracionada e biossinteticamente dirigida de aminoácidos com ^{13}C , seguida por análise METAFoR de espectros de RMN, permitiram quantificar metabolitos intracelulares derivados de substratos específicos como a His que evidenciam atividade anabólica da via PP, detetando fragmentos C5 de glicose intatos no *pool* das pentoses (188) (189). Estes resultados constituem evidências do fluxo anabólico significativo pela via PP com formação do precursor de biomassa pentose-5-fosfato (P5P), onde mais de 32% desse intermediário se formou diretamente a partir da glicose graças à contribuição de transcetolases associadas ao catabolismo da glicose que facilitam a transferência do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) da via glicolítica para via PP não oxidativa (187).

O citrato, outro intermediário do ciclo também pode ser transferido do mitocôndrio para o citoplasma. O acetil-CoA, um precursor para síntese dos ácidos gordos de cadeia longa e esteróis, gerado no mitocôndrio pelo complexo piruvato desidrogenase não é facilmente transportado pela membrana interna mitocondrial. O passo que envolve a clivagem do citrato permite ultrapassar este problema. O citrato gerado pelo enzima citrato sintetase do ciclo do citrato, pode ser transportado através da membrana mitocondrial interna pelo transportador tricarboxilato. Este é então clivado no citoplasma pelo enzima ATP citrato liase, também designado por enzima envolvido na clivagem do citrato, para formar acetil-CoA e oxaloacetato, reação que não corresponde à reversão da que é catalisada pelo enzima citrato sintetase, uma vez que requer a hidrólise de ATP (Figura 1.1). O oxaloacetato pode entretanto ser rapidamente reduzido a malato, que é posteriormente convertido pelo enzima malato desidrogenase em piruvato e NADPH, uma fonte de equivalentes redutores indispensáveis a processos biossintéticos que ocorrem no citoplasma, como a biossíntese de ácidos gordos (Figura 1.1).

O citrato desempenha assim um segundo papel na biossíntese dos ácidos gordos como ativador alostérico do enzima acetil-CoA carboxilase que catalisa um eventual

passo limitante da lipogénese. O citrato conduzido para o citoplasma não pode regressar ao mitocondrio porque o seu transporte dá-se a uma taxa insignificante através da membrana interna mitocondrial. Contudo, a redução do oxaloacetato a malato que pode ser descarboxilado a piruvato, pelo enzima malato desidrogenase, permite ao piruvato ser importado para o mitocondrio e seguir o seu percurso metabólico oxidativo habitual (Figura 1.1).

A maior parte das células eucariontes, como as de levedura, outros fungos, células vegetais (sementes) e células animais (adipócitos) acumulam lípidos. A extensão em que o fazem varia fortemente de espécie para espécie, exibindo cada caso diferente capacidade lipogénica. Nenhuma hipótese foi ainda levantada de forma a explicar esse tipo de diferenças, apesar de diversos investigadores proporem como principal ponto de controlo da taxa de síntese de lípidos o enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) (190) (191) (192). Contudo, a disponibilização do próprio acetil-CoA como unidade de dois carbonos utilizável na biossíntese de resíduos acilo, não constitui o passo limitante da acumulação de lípidos. Em microrganismos oleaginosos o acetil-CoA é gerado via acetil-CoA liase (ACL) (193), uma via comum à sua formação em plantas (194) (193). Contudo a atividade ACL não tem sido correlacionada com a extensão da acumulação de lípidos em microrganismos oleaginosos. A possibilidade de a atividade diacilglicerol: acil transferase (DAGAT) poder constituir o passo final da construção de triacilgliceróis, poderá conferir-lhe um papel crucial na acumulação de lípidos (195). O enzima malato desidrogenase (MDH2) parece desempenhar um papel importante na disponibilização de equivalentes redutores, sob a forma de NADPH utilizáveis na biossíntese de lípidos *in vivo*, uma vez que nenhum outro enzima consegue duplicar a geração desses equivalentes redutores em resposta a estímulos celulares. Por outro lado, a perda da atividade malato desidrogenase (MDH2) parece bloquear a acumulação de lípidos. Aparentemente, nenhuma outra atividade enzimática tem mostrado uma correlação tão forte com a extensão da acumulação de lípidos. Assim o factor crucial na regulação da acumulação de lípidos parece dar-se ao nível da disponibilização de equivalentes redutores e não dos níveis de fonte de carbono, inferindo-se deste modo um papel relevante e específico do enzima malato desidrogenase no aprovisionamento de NADPH para a síntese de lípidos. A existir um metaboloma lipogénico (160), do qual façam parte o enzima ATP citrato liase (ACL) e o complexo multienzimático ácido gordo sintase (FAS), também deve incluir o enzima malato desidrogenase (MDH2)

(194) (196). A regulação do referido enzima parece implicar mecanismos de pré-tradução, nomeadamente ao nível do processamento do RNA (196).

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é o enzima chave da via das pentoses fosfato (PP), uma série de reações que têm lugar no citoplasma cujo papel principal consiste na geração de equivalentes redutores sob a forma de NADPH indispensáveis à biossíntese *de novo* de materiais celulares, como os constituintes lipídicos, terpénicos e esteroídicos da célula; a produção de ATP a partir da glicose desde que se formem esses equivalentes redutores, e ainda a formação de ribose-5-fosfato, um precursor de nucleótidos (197) (198).



A desidrogenação da glicose-6-fosfato é maioritariamente controlada pelos níveis intracelulares de NADP^+ . A presença do grupo fosfato no NADPH permite distingui-lo do NADH, facto que facilita a estabilização do ambiente redutor intracelular por maximização das razões $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ e NADH/NAD^+ . Desta forma os processos biossintéticos e a glicólise podem permanecer ativos em simultâneo e a taxas elevadas.

Os equivalentes redutores gerados por esta via podem ser ainda utilizados na resposta antioxidante mediada pelo ciclo de oxidação-redução do glutatíono como descrito no ponto 1.5 (198) (199).

1.5. *Stress oxidativo e resposta antioxidante em Saccharomyces cerevisiae*

O oxigénio diatómico pode ser considerado um diradical uma vez que a sua distribuição eletrónica mais estável, ou seja aquela que está presente no ar que inspiramos, possui dois eletrões desemparelhados em orbitais π^* antiligantes distintas, com o mesmo estado de spin. O dióxigénio pode assim ser considerado um agente oxidante por ser capaz de oxidar diretamente outro átomo ou molécula ao aceitar um par de eletrões com o mesmo estado de spin e que ocupam orbitais π^* parcialmente preenchidas. No entanto, o O_2 só pode aceitar um eletrão de cada vez, uma vez que de acordo com princípio de exclusão de Pauli, qualquer par de eletrões localizados numa orbital atómica ou molecular deve possuir estados de spin opostos. Esta restrição quântica explica a baixa reatividade do dióxigénio com não-radicais. Contudo a adição sequencial de um ou mais eletrões ao O_2 pode gerar espécies reativas (RS), como o radical anião superóxido ($^{\cdot}O_2^-$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$) com elevada capacidade para danificar estruturas lipídicas, proteicas e nucleotídicas da célula (62). As referidas espécies reativas de oxigénio (ROS) podem formar-se naturalmente na sequência de estímulos ambientais ou por reações paralelas do metabolismo energético aeróbio. A respiração mitocondrial que engloba a fosforilação oxidativa, contribui com a maior porção de ROS formada na célula eucarionte (200) (201). Os locais onde ocorre a fosforilação de ATP acoplada ao fluxo de eletrões desde o NADH ou FADH₂ até ao O_2 , constituem pontos de fuga de eletrões capazes de reduzir diretamente o dióxigénio e de gerar ROS ao nível da membrana interna mitocondrial de eucariontes como a de *S. cerevisiae* (Figura 1.1 e 1.3). De forma semelhante, a utilização do dióxigénio como aceitador de eletrões no processo que assiste ao enrolamento/endobrimento oxidativo das proteínas de membrana, leva a que o retículo citoplasmático possa também constituir fonte endógena de ROS. A β -oxidação de resíduos acilo que em levedura decorre maioritariamente no peroxissoma é igualmente considerada, por diversos autores, como um processo de geração endógena de ROS muito depende das condições de crescimento (200) (202). As células de levedura podem ainda contactar com espécies reativas de oxigénio de origem exógena como aquelas que são induzidas por xenobióticos, agentes cancerígenos e radiação (203).

Na década de 50 do século passado Denham Harman propôs uma teoria sobre o envelhecimento celular assente nesses pressupostos que foi posteriormente renomeada como teoria do *stress* oxidativo. Atualmente admite-se que o desequilíbrio na composição do meio intracelular entre espécies pró e antioxidantes pode levar à acumulação de danos oxidativos com perda progressiva da funcionalidade celular que determina o envelhecimento e morte prematuros (204).

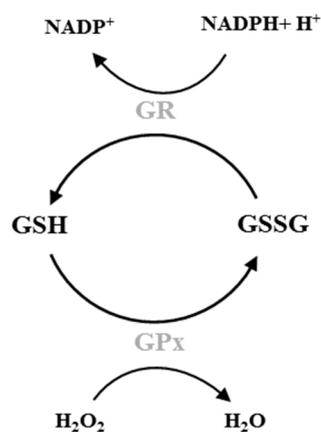
Apesar de muitos estudos de *stress* utilizarem o peróxido de hidrogénio como agente oxidante, devido à sua elevada solubilidade e estabilidade química, assume-se que nenhum agente oxidante pode ser considerado como indutor preferencial de *stress* oxidativo, uma vez que a maior parte das células consegue responder a estímulos despoletados pelas ROS ativando vias de resposta antioxidantes específicas (205).

As espécies oxidantes podem ser agrupadas de acordo com a sua natureza química ou reatividade em *i*) espécies radicalares que possuem um electrão desemparelhado na sua orbital externa como os radicais hidroxilo (HO^\bullet), óxido nítrico (NO^\bullet) e o radical anião superóxido ($^\bullet\text{O}_2^-$) ou em *ii*) espécies não-radicalares de elevada reatividade, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (206).

O H_2O_2 pode formar-se pela redução direta do O_2 ou como produto da respiração aeróbia, por dismutação do radical $^\bullet\text{O}_2^-$. Em geral, potencia a ocorrência de danos celulares em condições de *stress* oxidativo, por ser lipossolúvel e difundir facilmente através da membrana celular. Contudo, esta molécula pode ainda ser utilizada em pequena extensão por vias de sinal, regulando diversos processos biológicos como a morte celular (205). A remoção do peróxido de hidrogénio pode dar-se por reações de Fenton e Haber-Weiss, mediadas por metais de transição, com consequente formação do radical hidroxilo ($^\bullet\text{OH}$), um oxidante potente, capaz de gerar radicais lipídicos que em presença do radical anião superóxido podem converter-se em lipoperóxidos (207) (208) (209) (210). A exposição de leveduras a drogas que perturbem o ciclo do glutathione pode em muitos casos despoletar a geração de radical hidroxilo (211). Quando a célula se encontra em *stress* oxidativo pode: *i*) ativar adaptativamente vias de resposta antioxidativas que anulem o excesso de ROS; *ii*) despoletar mecanismos de morte por necrose onde ocorre perda da integridade membranar com libertação de conteúdos intracelulares; ou *iii*) despoletar morte por apoptose com formação de vacúolos citoplasmáticos e condensação da cromatina, sem perda da integridade membranar (212) (213) (214) (215).

A primeira linha de defesa contra as ROS passa por evitar a sua formação. A segunda linha de defesa envolve proteínas que as removem, bem como linhas de defesa secundária compostas por enzimas que removem e reparam produtos da oxidação de materiais biológicos (216).

As defesas antioxidantes podem ser não enzimáticas e enzimáticas. O tripéptido γ -glutamil-L-cistenilglicina vulgarmente designado por glutathione (GSH) desempenha um papel de relevo nas linhas de defesa não enzimáticas. O glutathione captura espécies reativas através do seu grupo sulfidrílo transformando-se em dissulfureto de glutathione (GSSG). Esta reação pode dar-se espontaneamente ou ser catalisada pelo enzima glutathione peroxidase (GPx) que desempenha um papel crucial na resposta antioxidante, reduzindo lipoperóxidos e/ou o peróxido de hidrogénio a alcoóis ou água, acoplada à conversão de glutathione em dissulfureto de glutathione (Figura 1.1). A reposição dos níveis de GSH decorre sob ação do enzima glutathione redutase (GR) que utiliza os equivalentes redutores sob a forma de NADPH, gerados pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) um enzima chave da via das pentoses fosfato, como já foi descrito anteriormente (Figura 1.1 e 1.3) (217)(218) (219) (220).



O ciclo de oxidação-redução em que participam os enzimas GR e GPx permite manter a capacidade antioxidante nas células de levedura (Figura 1.1 e 1.3), por estabilização da razão glutathione/dissulfureto de glutathione entre 1 e 4 (221) (222). A literatura descreve diversos metais com capacidade para inibir enzimas envolvidos no metabolismo do glutathione, em particular o enzima glutathione redutase, confirmando a

importante interferência destes elementos no ciclo de oxidação-redução do glutatono (223) (224).

O gene *gsh1* que codifica o enzima γ -glutamylcisteína sintetase e o gene *gsh2* que codifica o enzima glutatono sintase encontram-se diretamente envolvidos na biossíntese do GSH em *S. cerevisiae*. Leveduras mutantes nulas em *gsh1* mostraram-se totalmente dependentes de fontes externas de GSH para assegurar o seu desenvolvimento, enquanto que mutantes nulas em *gsh2* conseguiram crescer em meios não suplementados. Além disso, mutantes deficientes em *gsh1* foram incapazes de crescer em meios não fermentativos como aqueles em que utilizam glicerol como fonte de carbono (62).

A transferência de equivalentes redutores, sob a forma de NADPH, para o ciclo do glutatono é mediada pelo G6PD, um enzima cujo papel foi descrito anteriormente com maior detalhe a propósito da importância da via das pentoses fosfato no metabolismo energético, na disponibilização de precursores metabólicos que assistem ao crescimento celular e na resposta antioxidante de eucariontes (Figura 1.1) (225).

Para além dos enzimas do ciclo do glutatono, as células possuem uma linha complementar de defesa enzimática que está envolvida na remoção das ROS ou na reparação dos danos celulares por elas induzidos, revertendo parcial ou totalmente as condições de *stress* oxidativo. Os enzimas catalase que participam na conversão do peróxido de hidrogénio em dióxigénio e água, são particularmente sensíveis a metais devido à presença do átomo de ferro do núcleo protoporfirínico IX do grupo hemo. Em *S. cerevisiae* existe a catalase A com localização peroxissomal (CTA 1) e a catalase T (CTT 1) com localização citoplasmática, ambas atuando de acordo com a equação:



A literatura revela que leveduras em fase estacionária que não expressem os genes *cta1p*, codificante de CTA1 e *ctt1p* codificante de CTT1 exibem hipersensibilidade a peróxidos, demonstrando assim o papel relevante que estes enzimas desempenham na resposta antioxidante de *S. cerevisiae* (226).

Os enzimas superóxido dismutase (SOD) que podem assumir localização citoplasmática (Cu/ZnSOD, SOD1) e mitocondrial (MnSOD, SOD2) catalisam a conversão do radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio e água:



Os enzimas Cu/ZnSOD são os principais responsáveis pela remoção do anião superóxido do citoplasma e possivelmente dos peroxissomas. Os enzimas MnSOD protegem maioritariamente o mitocôndrio do radical anião superóxido gerado pelo metabolismo respiratório (Figura 1.1). Estirpes contendo mutações no gene mitocondrial do enzima MnSOD são sensíveis a concentração elevada de dióxigénio, apesar do seu crescimento em níveis de dióxigénio atmosférico ser aparentemente normal. Em contraste, estirpes contendo mutações no gene Cu/Zn sod tornam-se intolerantes a qualquer nível de dióxigénio (227).

A célula pode entrar em *stress* oxidativo quando o fluxo de eletrões no mitocôndrio por inibidores específicos ou concentração limitante de ADP ou ainda pela presença de xenobióticos que aceitem electrões da cadeia respiratória e os transferem para o dióxigénio. Em qualquer dos casos a formação de radical anião superóxido e de outras ROS é particularmente estimulada (213).

Os peroxissomas de levedura são cruciais para o metabolismo de substratos específicos como resíduos acilo, n-alcanos, D-aminoácidos ou metanol. Estes substratos comportam-se como indutores da biogénese de peroxissomas, condicionando a quantidade e a expressão génica de enzimas peroxissomais específicos (228).

A geração de ROS, maioritariamente H₂O₂, pode ainda ocorrer, pela ação de diversos enzimas peroxissomais, entre os quais se destacam acil-CoA oxidases que participam na degradação dos ácidos gordos via β-oxidação. Como consequência, leveduras que cresçam na presença de resíduos acilo, apresentam níveis elevados de catalases induzidos por quantidade elevada de H₂O₂ produzida nos peroxissomas (229).

1.6. Influência da temperatura em sistemas biológicos

A velocidade de qualquer reação química em meio homogéneo depende da frequência de colisões entre reagentes, factor que pode ser influenciado pela concentração dos mesmos e pela energia cinética que lhe está associada. Deste modo, numa reação entre um enzima E e um determinado substrato S, a frequência de colisões pode ser calculada pelo produto de uma constante por $[E][S]$. Todavia, a frequência de colisões não é proporcional à velocidade da reação, pois apenas uma pequena proporção dessas colisões ocorre com energia suficiente, a energia de activação, E_a , para a promover. A lei de Maxwell-Boltzman indica que a fração de moléculas de um dado sistema que atinja esse mínimo de energia a uma dada temperatura, T, é aproximadamente proporcional ao termo $e^{-E_a/RT}$, onde R representa a constante dos gases perfeitos. Deste modo, a frequência de colisões eficazes é dada pela equação:

$$\text{Frequência de colisões eficazes} = v = \text{constante } [E][S] e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

$$\text{a qual pode ser reescrita na forma: } v = k[E][S] \quad (2)$$

onde, o coeficiente de velocidade, k, é igual ao produto de uma constante de tempo por $e^{-E_a/RT}$, ou mais especificamente

$$k = pZ e^{-E_a/RT} \quad (3)$$

onde p representa a probabilidade de uma reação ocorrer quando os reagentes colidem entre si e depende de vários factores que incluem a orientação das moléculas em colisão; onde Z representa a frequência de colisões, ou seja, o número total de colisões por unidade de tempo, por unidade de concentração. Para uma reação bi-molecular, $e^{-E_a/RT}$ representa a fração total de moléculas reagentes com energia igual ou superior à de activação e k representa o coeficiente de velocidade, como por exemplo k_1 para a reação de formação do complexo enzima-substrato. O parâmetro Z é um factor de energia cinética que consequentemente varia com a temperatura T. No entanto, pequenas alterações desta, exercem um efeito relativamente pequeno sobre Z (230) (231).

A relação expressa na equação (3) foi descoberta empiricamente por Arrhenius em 1889 (232), antes da teoria das colisões dos gases ser divulgada, sendo usualmente representada pela equação

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (4)$$

Num sistema simples em equilíbrio $V_{\max}/[E]t = k_p$, um coeficiente de velocidade de ordem 1. Uma representação gráfica do logaritmo neperiano de $V_{\max}/[E]t$ em função do inverso da temperatura, permite calcular a energia de ativação para o passo catalítico. Na prática, basta representar apenas o logaritmo neperiano de V_{\max} , uma vez que a velocidade máxima de uma determinada preparação é proporcional ao k_p , tendo em mente que a representação do $\ln V_{\max}$ em função do inverso da temperatura $1/T$ é linear. Como o K_m varia com a temperatura, não se pode assumir que uma determinada concentração de substrato seja saturante em todas as condições de temperatura estudadas. Para muitas reações enzimáticas a V_{\max} depende de diversos coeficientes de velocidade em que cada um deles pode ser afetado por alterações na temperatura. Assim, a E_a calculada a partir da representação de Arrhenius será sempre um valor aparente ou "médio". A própria representação de Arrhenius pode não ser linear, se os passos limitantes forem diferentes para as condições de temperatura escolhidas. Em alguns casos a representação gráfica pode apresentar um declive acentuado a determinada temperatura, denominada de transição, onde as alterações da V_{\max} dependem do passo limitante. A temperatura de transição pode ser correlacionada com a composição de resíduos acilo da membrana celular e presumivelmente os resultados de transição podem ser associados a alterações na fluidez da membrana. Uma queda brusca na representação de Arrhenius sugere desnaturação proteica (233) (234). Para explicar a necessidade de um mínimo de energia para a espontaneidade de uma reação, Eyring 1935 (235) propôs a teoria do estado de transição. Esta teoria estabelece que as moléculas reagentes devem ultrapassar uma barreira de energia e passar por um estado de transição denominado complexo ativado antes de darem produtos de reação. O complexo activado é considerado instável e transitório onde as ligações químicas e a sua orientação se encontram distorcidas. Quando os reagentes atingem o estado de transição estão preparados para dar produto da reação a uma taxa independente da temperatura e da natureza dos reagentes, isto é, transitam para o outro lado da barreira de energia para atingir o novo estado fundamental. Se assumirmos a hipótese do equilíbrio entre moléculas reagentes que atingem o topo da barreira de energia de ativação as diferenças de energia podem ser descritas por funções termodinâmicas, K^\ddagger , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , assim como pela E_a e k_1 , sendo o K^\ddagger uma constante de equilíbrio dinâmica mais próxima do

K_m em vez de K_s . Neste contexto o coeficiente de velocidade da reação pode ser calculado de acordo com a equação:

$$k = \frac{\kappa T}{h} \frac{e^{\Delta \ddagger S^\circ}}{R} \frac{e^{\Delta \ddagger H^\circ}}{RT} \quad (5)$$

Os organismos vivos regulam as suas atividades e modulam as suas interações com o ambiente para alcançarem a homeostase. Flutuações mínimas nas condições de crescimento nos limites de tolerância dos sistemas celulares são tamponadas pelos componentes existentes. No entanto, em eventos onde ocorram alterações ambientais maioritariamente citotóxicas, como a subida da temperatura, da concentração de ácidos ou solventes orgânicos ou da osmolaridade para níveis muito elevados, ou ainda a depleção de nutrientes do seu ambiente natural ou durante as suas aplicações industriais; todos os tipos de células são capazes de distinguir a natureza desse fator de *stress* e ativar programas de resposta apropriados para se adaptarem e sobreviverem. Esta resposta multifacetada inclui remodelação metabólica, paragem transitória do crescimento e alterações na transcrição (236) (237) (238). A resposta celular dos microrganismos ao choque térmico e/ou *stress* térmico bem como *stress* provocado por ácidos ou solventes tem vindo a ser amplamente estudado (236) (200) (239) (240).

Na literatura encontra-se descrito que a elevação da temperatura ou da concentração de álcoóis ou de ácidos carboxílicos pode provocar danos e desnaturação de biomoléculas como proteínas, DNA e RNA. Além disso, os sistemas membranares podem ficar estruturalmente destabilizados e permeabilizados, gerando efeitos adversos em processos associados às propriedades de membrana (236).

A *S. cerevisiae* tem sido considerada por diferentes autores como um adequado sistema experimental para avaliar como as células eucariontes reconhecem incrementos graduais de temperatura, mecanismos sensoriais ao *stress* térmico ou para testar respostas moleculares ao choque térmico (237) (238). A *S. cerevisiae* apresenta um ótimo de crescimento entre os 25 e os 30 °C. No entanto, quando a temperatura atinge os 36-37 °C, ativa um programa de proteção transcricional, designado por *heat shock response* (HSR) que provoca alterações fisiológicas ao nível da composição lipídica das membranas e do fluxo glucídico. Este microrganismo e outras leveduras mesófilas conseguem manter o crescimento a níveis de temperatura superiores a 42 °C, embora manifestem dificuldade em adaptar-se à exposição crónica a níveis tão elevados de

temperatura, uma vez que os enzimas RNA polimerase II encontram-se inativos (200) (241). Como as leveduras suportam uma gama elevada de temperatura durante um ciclo diurno/noturno, os estudos por indução de choque térmico (HSR) (30-37 °C), tornaram-se frequentes ao longo das últimas três décadas e tiveram como alvo principal avaliar a resposta metabólica condicionada pela reprogramação da expressão génica, em particular ao nível dos fatores proteicos reguladores da transcrição (200) (94). Embora a subida de temperatura represente um estímulo primário, o choque térmico com alteração repentina dessa condição de crescimento, tem como principal consequência secundária a geração de quantidade excessiva de espécies reativas de oxigénio (200) (203).

Estudos prévios desenvolvidos neste laboratório para avaliar a influência da temperatura no crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ revelaram que o conteúdo proteico total e do sobrenadante pós 12000 g diminuiu significativamente com a temperatura entre 25 e 40 °C enquanto que o nível de proteínas do sedimento pós 12000 g aumentou no mesmo intervalo de temperatura (242). Relativamente a células expostas a choque térmico 28/40 °C, o conteúdo proteico total e do sobrenadante pós 12000 g mostrou-se superior ao de células crescidas a 40 °C. Contudo, no sedimento, enriquecido em mitocôndrios e peroxissomas, manteve-se idêntico ao determinado na em células crescidas a 25 °C, mas inferior aos valores determinados nas leveduras crescidas a 28 e a 40 °C. Estes resultados permitiram inferir que o aumento da temperatura inibiu a produção de biomassa por *S. cerevisiae* UE-ME₃, resposta que parece ter sido parcialmente revertida em leveduras sujeitas a choque térmico (242).

O mesmo estudo revelou que a razão GSH/GSSG do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ apresentou um mínimo em células crescidas a 28 e a 30 °C. No entanto em células crescidas a 40 °C observou-se um aumento altamente significativo deste parâmetro relativamente a células sujeitas aos restantes tratamentos térmicos. Este tipo de resposta não parece corresponder a um incremento da capacidade antioxidante uma vez que o conteúdo em tióis totais não proteicos (GSH + GSSG) atingiu o valor mais baixo de qualquer dos ensaios de temperatura superior a 25 °C. Provavelmente a perda evidente de capacidade para estabilizar o ambiente redutor intracelular a 40 °C poderá ser devida ao decréscimo altamente significativo da atividade G6PD com indisponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, indispensáveis ao bom funcionamento do ciclo do glutationo (242). Todavia, o choque térmico 28/40 °C reverteu o aumento da razão GSH/GSSG e o decréscimo da actividade G6PD para

valores próximos dos detetados em células crescidas a 25°C. O estudo preliminar revelou ainda que o máximo de actividade CTT1 e CTA1 foi observado em células crescidas a 28 °C, ocorrendo um decréscimo significativo destes parâmetros em células cujo crescimento foi mantido a temperatura superior a 28°C. Os enzimas catalase em choque térmico 28/40 retomaram ótimos de actividade significativamente superiores aos detetados a 28 °C (242).

Pelo exposto, pôde-se assumir que o ótimo de crescimento *S. cerevisiae* UE-ME₃ manifestou-se a 28 °C enquanto que o limiar inferior de sobrevivência foi detetado quando as leveduras cresceram a 40 °C. Outro aspeto relevante prende-se com o facto de as perturbações no crescimento e marcadores antioxidantes, descritas previamente para células crescidas a 40 °C, parecem ter sido revertidas em condições de choque térmico 28/40 °C (242).

1.7. Nanopartículas de dióxido de titânio

A nanotecnologia é uma área em desenvolvimento exponencial que utiliza nanomateriais, definidas na norma ISO/TR 27.628 (243) como partículas com um diâmetro nominal inferior a 100 nm (Figura 1.4), com origem em fontes primárias ou naturais e em fontes secundárias ou artificiais.

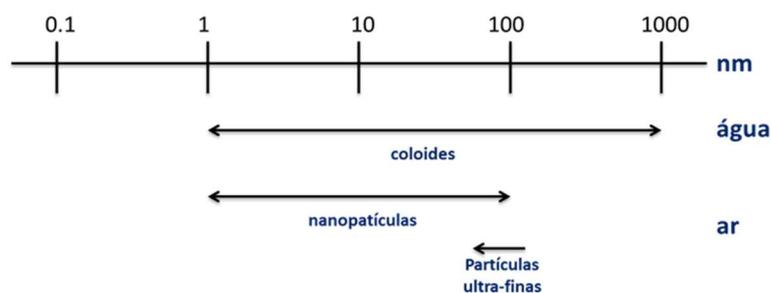


Figura 1.4 Definição de diferentes classes de partículas (adaptado de (244)).

As nanopartículas têm sido utilizadas na indústria química, no diagnóstico clínico, na administração de medicamentos e na terapia génica e do cancro (245) (246) (247). Essas substâncias podem ser mono ou multidimensionais e apresentar estrutura interna/externa organizada ao nível da nanoescala. As nanopartículas exibem propriedades e características novas, comparativamente com as detetadas no mesmo tipo de compostos com organização macro ou micromolecular (248). Os nanomateriais

incluem, por exemplo, metais ou óxidos de metais, nanotubos de carbono, fulerenos, silicatos, nanopartículas orgânicas ou nanocompósitos (248).

Algumas nanopartículas têm sido utilizadas na modulação de processos bioquímicos, sendo promissora a sua aplicação em quimioterapia do cancro. Estudos realizados no domínio da nanotecnologia estabelecem que os nanomateriais possuem três propriedades peculiares que condicionam a sua ação: massa fixa, densidade unitária e biorreatividade superficial (249) (250).

Embora o termo nanopartículas designe apenas estruturas no seu estado isolado e os seus agregados e aglomerados não sejam abrangidos por esta designação, estes têm sido, na maior parte dos casos, incluídos em estudos com nanomateriais, razão pela qual muitos autores utilizam atualmente o termo nanopartículas de forma mais abrangente (251).

Apesar de a dimensão molecular das nanopartículas ser considerada a característica que melhor as define, a sua forma é também determinante do seu comportamento reacional. Por exemplo, nanotubos de carbono, de fulerenos e de folhas de grafeno exibem propriedades químicas distintas. Além disso, a atividade catalítica de nanopartículas de óxidos de metais pode ser fortemente influenciada pelo tamanho e pela sua organização espacial. A geração de radicais $\bullet\text{OH}$ pela dissociação do solvente (água) devido a interações de superfície pode influenciar fortemente as propriedades de nanopartículas metálicas (252) (253) (254).

Apesar de recentemente ter aumentado a quantidade de estudos que procuram estabelecer uma relação coerente entre a atividade biológica dos nanomateriais e propriedades físico-químicas que lhe são inerentes como o tamanho, a organização no espaço ou a fase em que se encontram, existe ainda um longo caminho a percorrer para detetar e caracterizar com certeza os seus potenciais efeitos biológicos (245) (255) (256) (250) (257) (256) (258). Por exemplo, estudos realizados por Warheit e colaboradores em 2007, para avaliar a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio de três tamanhos moleculares e duas fases cristalinas distintas em pulmão de rato, revelaram numa primeira aproximação não existir correlação entre a toxicidade e o tamanho ou a área superficial desses materiais. Todavia, um estudo mais aprofundado, realizado pelo mesmo grupo de investigadores, onde foram avaliados os efeitos de três amostras de nanopartículas de dióxido de titânio, com fase cristalina e dimensão molecular distintas,

sobre fibroblastos e células epiteliais de pulmão humano, detetou alterações toxicológicas correlacionáveis com a área superficial das nanopartículas (256).

Além do que foi referido anteriormente, estudos realizados por Oberdörster (259) (250), para avaliar a toxicidade pulmonar de partículas de dióxido de titânio com 20 nm (80% anatase) e 250 nm (100% anatásio) em rato, sugeriram que a área superficial poderia determinar a intensidade do estado inflamatório pulmonar. No entanto, esses autores não conseguiram demonstrar de forma inequívoca que o tamanho e a fase cristalina dessas partículas influenciavam a sua atividade biológica. Tal facto poderá ser devido a caracterização insuficiente das amostras, em termos de dimensão molecular e fase cristalina (260).

O titânio é um metal de transição relativamente forte e dútil, localizado no quarto grupo da tabela periódica que apresenta elevados pontos de fusão (1668 °C) e de ebulição (3287 °C), baixa massa específica de 4,54 g.cm⁻³ e módulo de elasticidade acima de 12,7 x 10⁴ MPa (261). A grande resistência e relativamente baixa densidade do titânio estão relacionados com a distribuição eletrónica desse elemento que permite o estabelecimento de ligações fortes e longas entre os átomos do metal (262).

As propriedades benéficas dos óxidos de titânio para os seres vivos, como a biocompatibilidade, baseiam-se na sua organização em camadas que se estabelece naturalmente em ambientes oxigenados (262).

Cerca de 90% dos minerais de titânio da crosta terrestre são utilizados na produção do dióxido de titânio. A opacidade, alvura, resistência ao ataque químico, poder de cobertura e baixa toxicidade do dióxido de titânio (TiO₂), faz com que seja amplamente utilizado no fabrico de tintas, papel, plástico, borracha, fibras, vernizes, próteses (263).

Uma consequência inevitável do rápido crescimento da nanotecnologia diz respeito à exposição dos seres vivos, em particular o homem, a nanopartículas e sua toxicidade (264) (244) (248) (265). As nanopartículas de TiO₂ (TiO₂-NP) utilizadas nos protetores solares possuem elevado nível de penetração, facto que facilita a sua absorção pelo sistema linfático, ao passo que partículas com mais de 1 µm de diâmetro não o conseguem. Estudos *in vivo* revelaram que a exposição de animais de laboratório a TiO₂-NP desencadeia inflamação pulmonar causando danos que podem levar à morte celular (266) (250) (267).

A superfície das nanopartículas de dióxido de titânio apresenta uma camada de átomos de oxigénio e outra de átomos de titânio, suscetíveis a alterações de carga superficial que varia de acordo com o pH do meio onde as nanopartículas se encontram inseridas. Desta forma meios com pH a variar entre 5-7 conferem às nanopartículas carga nula; $\text{pH} > 7$, carga negativa e $\text{pH} < 5$, carga positiva. Quando o pH se encontra localizado entre 5-7, as nanopartículas formam aglomerados, devido ao potencial electrostático de superfície nulo, devido à falta de repulsões, diminuindo a sua área superficial devido à aglomeração. (268).

Além disso, a carga constitui um factor muito importante não só na determinação da estabilidade de complexos, mas também na extensão das interações NP- membrana celular (269). A membrana celular em repouso exhibe um potencial de membrana de aproximadamente -70 mV. Este é assegurado por dois factores: a permeabilidade da membrana plasmática a diferentes iões e a diferença de concentração iónica entre os fluidos intra e extracelulares. Quando a carga interna e externa da membrana difere entre si, diz-se que a membrana se encontra polarizada. Do lado interno da membrana, moléculas como proteínas, nucleótidos, e grupos fosfato de diversos intermediários encontram-se carregados negativamente (aniões). Devido às interações electrostáticas que estabelecem com a vizinhança atraem outras moléculas de carga positiva para o lado externo da membrana (270). Factores como a variação da temperatura ou de pH do meio provocam a despolarização local da membrana e consequente abertura de canais de sódio dependentes da diferença de potencial. Quando os iões carregados positivamente entram na célula, o potencial de membrana torna-se menos negativo, cessando ou diminuindo a importação de cargas positivas (270).

O processo de internalização de nanopartículas em células de levedura encontra-se ainda parcamente descrito, contudo, alguns autores afirmam que *Saccharomyces cerevisiae* apresenta maior resistência à internalização de nanopartículas de titânio do que bactérias Gram (+) ou células animais, uma vez que a rigidez estrutural da sua parede celular parece minimizar a absorção direta de nanopartículas (271). Contudo, interações nanopartículas-célula podem induzir a formação *de novo*, de poros com dimensão superior à habitual e assim fomentar a sua internalização através da parede celular (272). Quando as nanopartículas atingem a membrana celular, podem interagir com esta de forma específica, por interação do tipo ligando-recetor ou de forma inespecífica, despoletando a formação de invólucros membranares que envolvem as

nanopartículas e as transportam para o interior celular (273). Assim, as nanopartículas podem atravessar a membrana utilizando proteínas de transporte ou canais iónicos da membrana ou por endocitose. Quando o processo de transporte de nanopartículas envolve proteínas ou canais iónicos, estas podem exercer efeitos prejudiciais diretos sobre a membrana, modificando a sua composição lipídica e fluidez, através de um mecanismo adaptativo que provavelmente envolve a regulação de atividades insaturases específicas. (274).

No interior celular, as NP podem invadir vários organelos como o retículo endoplasmático ou complexo de Golgi, interferindo nos processos metabólicos que neles ocorrem com eventual geração de ROS (274) (275). A bibliografia revela que danos no DNA mediados por agentes oxidantes constituem um fator chave na morte celular por apoptose. Alguns autores descrevem as TiO₂-NP como indutoras de apoptose em diversos tipos de células, embora os mecanismos de sinalização que conduzem à morte celular permaneçam, na maior parte dos casos, por esclarecer (276) (277) (266). Contudo, alguns estudos sugerem que a apoptose induzida por TiO₂-NP em linfócitos humanos ocorre por ativação de caspases 8 e 3 (276).

Estudos prévios realizados no nosso laboratório onde se testaram diferentes níveis de concentração de nanopartículas de dióxido de titânio (0,1-5 µg/mL) revelaram que culturas de *S. cerevisiae* crescidas a 28 °C, utilizando glicose como fonte de carbono e expostas a TiO₂-NP (5µg/mL) exibiram um mínimo de biomassa celular produzida, um decréscimo da razão GSH/GSSG, um marcador de *stress* oxidativo, bem como um decréscimo das atividades enzimáticas GPx e CTA 1. Apesar de também ter ocorrido um aumento das atividades GR e CTT 1, na presença de TiO₂-NP, essa eventual resposta antioxidante foi insuficiente para estabilizar o ambiente redox intracelular e consequentemente prevenir a morte celular despoletada pela presença de nanopartículas no meio de cultura (278).

A continuação dos referidos estudos prévios realizados no nosso laboratório revelou ainda que a exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ acima dos 28 °C induzia morte celular, ocorrendo menor sobrevivência a 40 °C, efeito que foi revertido na presença de TiO₂-NP na concentração de 1µg/mL, refletido pelo aumento do conteúdo total de proteínas, tióis não-proteicos e atividades enzimáticas ALP, G6PD, CTT e CTA. O nível de ROS intracelular apresentou um máximo em células crescidas a 28 °C na ausência de TiO₂-NP com aumento significativo desse valor em células crescidas na sua

presença, em qualquer das temperaturas testadas, excepto a 40 °C onde assumiu valores residuais. No entanto, o nível de ROS determinado em células submetidas a choque térmico 28/40 °C, apresentaram surpreendentemente um valor menor, ainda que um pouco superior ao determinado em células cultivadas a 40 °C.

Todavia, *S. cerevisiae* UE-ME₃, proliferativas, sujeitas a choque térmico 28/40 °C, durante 200 min, responderam à exposição a TiO₂-NP (1µg/mL) com aumento da morte celular expressa no decréscimo do conteúdo em proteínas total do sobrenadante e do sedimento pós 12000 g, peso seco, tióis não-proteicos, ou das atividades enzimáticas ALP, G6PD e CTA 1. Células em choque térmico 28/40 °C exibiram também um mínimo de concentração de MDA comparativamente com os valores determinados em qualquer dos ensaios de variação de temperatura na presença de TiO₂-NP (1µg/mL). Esta resposta pode dever-se aos níveis elevados de CTT 1 e moderados de CTA 1 que parecem compensar eventuais efeitos oxidantes pela temperatura e nanopartículas.

2. Problema e objetivos

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo cujas respostas ao potencial de destruição resultante de alterações ambientais, conduzem à atenuação ou inibição total do crescimento, pela indução de genes que codificam proteínas envolvidas na reparação de danos intracelulares, com perda de capacidade interna de reparação dos materiais celulares e de retorno a condições de crescimento adequadas. Por outro lado, bloqueiam ainda a tradução de proteínas ribossomais, de enzimas envolvidos no metabolismo glucídico, de desintoxicação de ROS, no *fold*ing e degradação de proteínas, que podem ser interpretadas como uma resposta directa ao *stress* expressa em diminuição de taxa específica de crescimento (84).

Na literatura encontra-se descrito que os níveis de ROS intracelular aumentam com a temperatura, podendo situações de choque térmico ser interpretadas como equivalentes a condições de indução de *stress* oxidativo (85), onde a sobreposição de choque térmico com outro agente de *stress* como metais de transição pode despoletar respostas pró e antioxidantes que contribuam para a morte celular ou para a termotolerância (62).

As semelhanças entre a repressão do metabolismo oxidativo de *Saccharomyces cerevisiae*, Crabtree-positiva, na presença de fontes de carbono não-fermentativas e a glicólise aeróbia detetada em células tumorais, reforçam a sua importância como modelo para rastreio da resposta a agentes terapêuticos anti-tumorais. O facto de as propriedades físico-químicas de nanopartículas de metais de transição dependerem da sua dimensão molecular, dota-as de reatividade diferencial sobre os seres vivos, tornando-as candidatas a agentes anti-tumorais.

Assim, procurar-se-á avaliar como a exposição a nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP) com diferente área superficial modula o efeito Crabtree em *S. cerevisiae* envolvendo a execução das tarefas:

- i) avaliação da viabilidade e danos celulares em *S. cerevisiae* expostas a TiO₂-NP, em choque térmico.
- ii) caracterização do catabolismo oxidativo e fermentativo da glicose em *S. cerevisiae* expostas a TiO₂-NP, em choque térmico;
- iii) caracterização da resposta antioxidante e tolerância ao choque térmico por *S. cerevisiae* expostas a TiO₂-NP.

3. Metodologia

3.1. Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este estudo obedeceu ao plano estratégico que se passa a descrever:

Local de realização: Laboratório de Bioquímica Analítica, Departamento de Química; laboratórios do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora.

Financiamento: Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011 e PEst-OE/AGR/UI0115/2014

Modelo biológico: *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe UE-ME₃

Fornecedor: coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora

Composto em estudo: TiO₂-NP (5 µg/mL) com diferente Ø molecular (<25 ou <100 nm)

Outros agentes de stress: fonte de carbono (glicerol e/ou glicose);
choque térmico 28/40 °C (HS)

Tratamentos:

Ensaio 0 duas condições experimentais, na primeira as células foram mantidas em meio YPG ao longo de todo o ensaio, na segunda condição experimental após as culturas em YPG atingirem a fase exponencial média foi induzido o efeito de Crabtree pela adição de glicose (2 %), meio YPGD durante 200 min.

Ensaio A adição de TiO₂-NP (5 µg/mL) com Ø molecular <25 ou <100nm, 100 min após a indução do efeito Crabtree (YPGD), com ou sem HS.

Ensaio B adição simultânea de glicose (YPGD) e TiO₂-NP (5 µg/mL) com Ø molecular <25 ou <100 nm com ou sem HS.

Frações celulares:

- Sedimento pós-12000g em Tampão Tris-sacarose (Tris-acetato (0,01 M) pH 7,5; sacarose (0,25 M)) (sedimentoTris-sacarose);
- Sobrenadante pós-12000g em Tampão fosfato (10mM) pH 7,0 (sobrenadanteTP);
- Sedimento pós-12000g em Tampão fosfato (10mM) pH 7,0 (sedimentoTP).

Parâmetros analisados:

Crescimento e viabilidade celular: μ , CFU e ALP

Marcadores enzimáticos do metabolismo energético: HKX, PYK, PDC, ADH, DLD, CS, SDH, NDE1, MAE1, MDH1, MDH3, MDH2 e G6PD

Marcadores enzimáticos antioxidantes: GR, GPx, SOD1, SOD2, CTT1 e CTA1

Marcadores não enzimáticos antioxidantes: GSH e GSSG

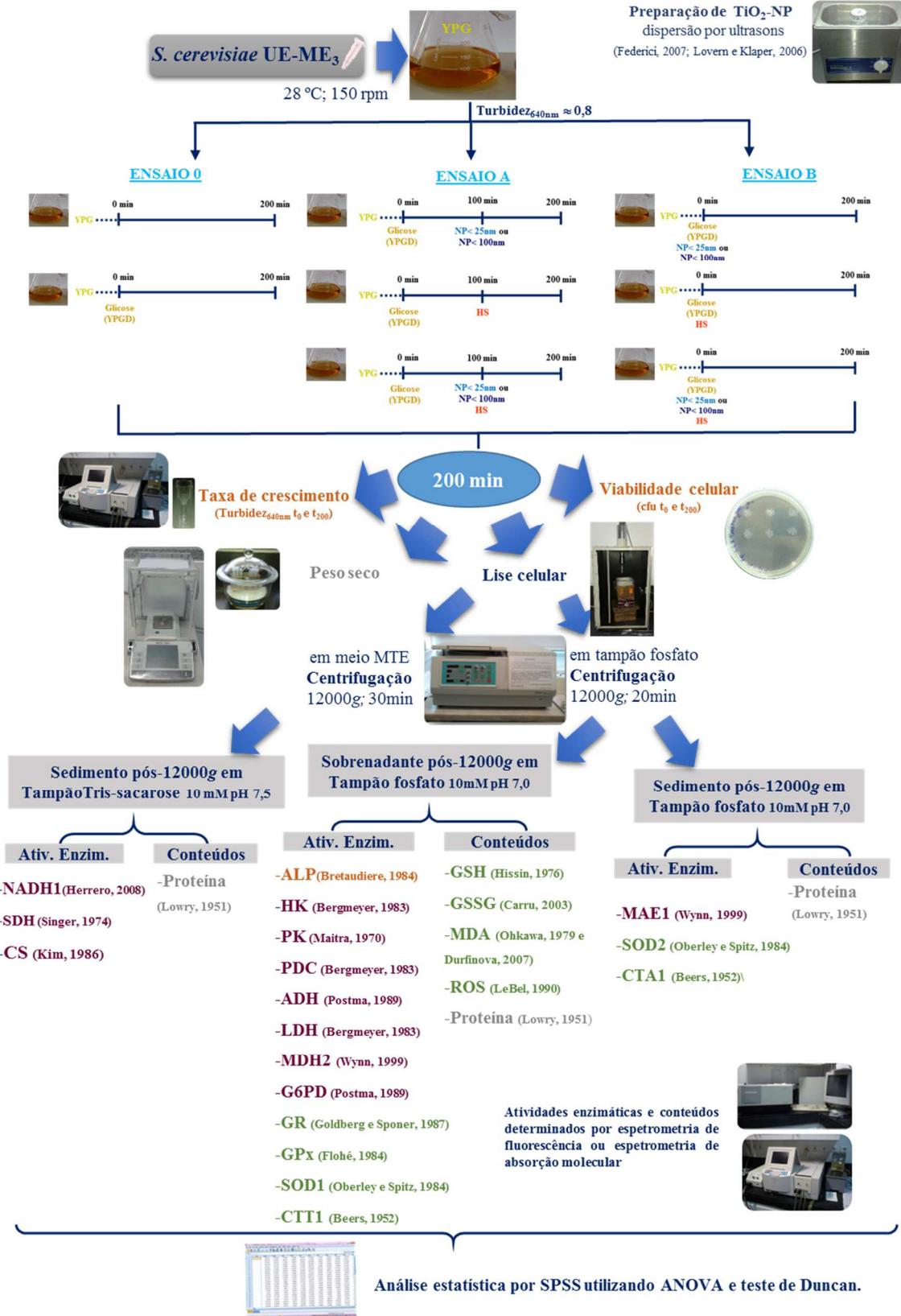
Marcadores de *stress* oxidativo e danos celulares: ROS e MDA

Técnicas utilizadas: Potenciometria; dispersão de materiais por ultra-sons; gravimetria; esterilização pelo calor seco/húmido; cultura de microrganismos; desintegração celular por ultra-sons; centrifugação diferencial; espectrometria de absorção molecular; espectrometria de fluorescência

Análise estatística dos resultados: Análise de variância simples, vulgarmente conhecida por ANOVA I, teste de significância de Duncan.

Desenvolvimento do trabalho: decorreu como se encontra sumariado no diagrama do trabalho apresentado na secção 3.2 seguindo-se o procedimento experimental e análise estatística dos resultados descrito na secção 3.3.

3.2. Diagrama do trabalho



3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Cultura de microrganismos e delineamento dos ensaios

Neste estudo foi utilizado como modelo biológico o eucarionte *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, estirpe isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo, depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora e utilizada no nosso laboratório, desde há alguns anos, em estudos de *stress* e regulação metabólica em presença de fenilureias, triazinas, organoclorados e metais de transição (110) (111).

Colónias isoladas de levedura, armazenadas no nosso laboratório a -80 °C, em meio de cultura e glicerol (30 %), permitiram obter cultura fresca de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio líquido YPG (extrato de levedura (1 %), peptona (2 %) e glicerol (3 %)) mediante crescimento *overnight* com agitação constante (180 rpm) à temperatura de 28 °C. Estas leveduras foram utilizadas para iniciar, em meio YPG (1/3 de líquido para 2/3 de ar) com agitação constante (150 rpm) à temperatura de 28 °C, as culturas que constituíram os ensaios designados por Ensaio 0, Ensaio A e Ensaio B (Figura 3.1). Estes ensaios foram delineados de forma a permitir compreender a influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, na viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico, no metabolismo energético e na capacidade antioxidante de *S. cerevisiae*, decorreram do momento t_0 , correspondente à fase exponencial média (turbidez_{640nm}~0,8) ao momento t_{200} , após 200 min de crescimento.

O Ensaio 0 foi constituído por duas condições experimentais, na primeira as células foram mantidas em meio YPG ao longo de todo o ensaio, isto é, de t_0 a t_{200} , na segunda condição experimental após as culturas em YPG atingirem a fase exponencial média (t_0) foi induzido o efeito de Crabtree em *S. cerevisiae* UE-ME₃ pela adição de glicose (2 %), meio YPGD durante 200 min (t_{200}) (Figura 3.1).

O Ensaio A foi estabelecido com o objetivo de avaliar se a adição de TiO₂-NP com diferente dimensão molecular (NP <25 ou NP <100 nm), 100 min após a indução do efeito Crabtree (YPGD), sujeitas ou não a choque térmico (HS), exibia capacidade para reverter o referido efeito. Neste ensaio foram constituídas cinco condições experimentais pela exposição a TiO₂-NP (5 µg/mL) de diferente dimensão molecular (NP <25 ou NP <100 nm) ou pela introdução de HS, alterando a temperatura de 28 para 40 °C, na ausência ou na presença de TiO₂-NP 100 min (t_{100}) após a adição de glicose (YPGD em t_0) perdurando o crescimento até t_{200} (Figura 3.1).

O Ensaio B foi estabelecido com o objetivo de avaliar se a adição inicial (t_0) e simultânea de glicose (YPGD) e TiO_2 -NP ($5 \mu\text{g/mL}$) sujeitas ou não a HS, exibia capacidade para evitar a evolução para fermentação aeróbia, determinada pela presença da glicose. Neste ensaio foram também constituídas cinco condições experimentais pela exposição a TiO_2 -NP ($5 \mu\text{g/mL}$) de diferente dimensão (NP <25 ou NP <100 nm) ou pela introdução de HS na ausência ou na presença de TiO_2 -NP em simultâneo com a adição de glicose (YPGD) em t_0 , permanecendo o crescimento até t_{200} (Figura 3.1).

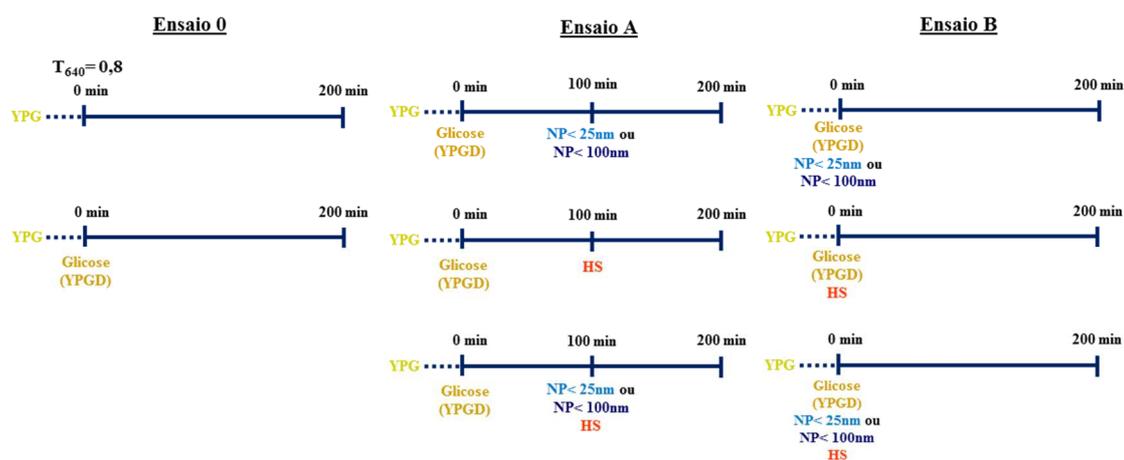


Figura 3.1 Diagrama representativo do delineamento das condições experimentais nos ensaios estabelecidos para o estudo da influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, na viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico, no metabolismo energético e na capacidade antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃.

3.3.2. Procedimentos preambulares

Neste capítulo foram descritas algumas execuções laboratoriais que antecederam o ensaio de exposição das leveduras a glicose, a nanopartículas e/ou choque térmico, destacando-se a preparação de suspensões de nanopartículas. Além disso a descrição de métodos utilizados na determinação de conteúdos celulares e atividades enzimáticas, como a determinação do peso seco, a obtenção de frações celulares e a quantificação proteica também foi abordada nesta secção.

3.3.2.1 Preparação de nanopartículas

Atualmente observa-se um incremento dos estudos que procuram estabelecer uma relação entre a atividade biológica dos nanomateriais e as propriedades físico-químicas que lhe são inerentes, tais como a dimensão molecular, contudo, existe ainda um longo caminho a percorrer para detetar e caracterizar os seus efeitos biológicos (245).

A opacidade, alvura, resistência ao ataque químico, poder de cobertura e baixa toxicidade do dióxido de titânio (TiO_2), faz com que seja amplamente utilizado no fabrico de tintas, papel, plástico, borracha, fibras, vernizes, próteses, bem como na forma de nanopartículas de TiO_2 nomeadamente em protetores solares (262). Consequência inevitável do rápido crescimento da nanotecnologia é a exposição dos seres vivos, em particular o homem, a nanopartículas e a ampliação do campo das suas aplicações (244) (264) (265).

Assim, neste trabalho nanopartículas de dióxido de titânio, com diferente dimensão molecular, foram utilizadas com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a sua influência na taxa específica de crescimento, na viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico, no metabolismo energético e na capacidade antioxidante de *S. cerevisiae*. Neste projeto de doutoramento foram utilizadas duas preparações de TiO_2 -NP, uma de dimensão inferior a 100 nm, área superficial $\geq 14.0 \text{ m}^2/\text{g}$ e grau de pureza superior a 97 % e uma outra de dimensão inferior a 25 nm, área superficial $45\text{-}55 \text{ m}^2/\text{g}$ e grau de pureza superior a 99,7 % na forma anatase, ambas adquiridas à Sigma-Aldrich. O processo de preparação da suspensão de TiO_2 -NP <100 e TiO_2 -NP <25 foi análogo nas duas situações e iniciou-se pela preparação da suspensão de TiO_2 -NP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em água ultrapura estéril a qual foi homogeneizada em banho de ultra-sons com frequência de 35 kHz durante 40-60 min, tendo-se acompanhado a formação da suspensão traçando o espectro de absorção molecular entre 250 e 700 nm, o qual, no final da preparação, apresentava um máximo de absorção a 329 nm (Figura 3.2) (279) (280).

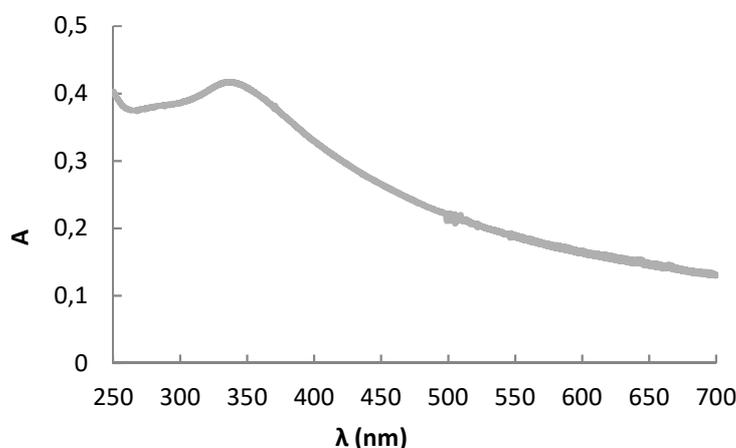


Figura 3.2 Espectro de absorção molecular de TiO_2 -NP.

3.3.2.2. Determinação do peso seco

A quantidade total de biomassa formada nas diferentes condições experimentais foi estimada pela determinação do peso seco no final do ensaio (t_{200}). Assim, foram recolhidas alíquotas nas cinco experiências independentes de todas as situações testadas e levadas à secura em estufa a 80 °C até se observar peso constante, pela pesagem em balança microanalítica. Os valores de peso seco foram utilizados para expressar o conteúdo específico em GSH, GSSG, ROS e MDA.

3.3.2.3. Fracionamento celular

Decorridos os ensaios, com duração de 200 min, as células foram recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 15 min a 4 °C, lavadas três vezes em água bidestilada estéril e recolhidas por centrifugação diferencial a 5000 g durante 15 min a 4 °C, após a qual o sedimento foi ressuscitado em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 e as células lisadas recorrendo a homogeneizador de ultra-sons (pulso de 0,1 kHz de 10 em 10 s durante 3x5 min). O homogeneizado celular obtido foi submetido a centrifugação diferencial a 5000 g durante 15 min a 4 °C, após a qual o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 g durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido (sobrenadanteTP) e o sedimento foi ressuscitado em 3 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 (sedimentoTP) (281) (282). Na preparação da fração celular rica em mitocôndrios no final dos ensaios, t_{200} , as células foram recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 15 min a 4 °C, lavadas três vezes em água bidestilada estéril e recolhidas por centrifugação diferencial a 5000 g durante 15 min a 4 °C, após a qual o sedimento foi ressuscitado em tampão TEM (Tris-acetato (0,05M) pH 7,5; EDTA (1mM) e manitol (0,25 M)) e lisado, recorrendo a homogeneizador de ultra-sons (pulso de 0,1 kHz durante 10 s durante 3x5 min). O homogeneizado celular obtido foi submetido a centrifugação diferencial a 5000 g durante 15 min a 4 °C, após a qual o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 g durante 30 min a 4 °C e o sedimento pós 12000 g foi ressuscitado em tampão Tris-sacarose (Tris-acetato (0,01 M) pH 7,5; sacarose (0,25 M)) para posterior utilização como sedimentoTris-sacarose (283).

As frações celulares correspondentes ao sobrenadanteTP, sedimentoTP e sedimentoTris-sacarose foram repartidas em alíquotas e guardadas a -20 °C para posterior determinação de conteúdos celulares e atividades enzimáticas de acordo com os procedimentos descritos nas secções 3.3.3 a 3.3.5.

3.3.2.4. Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteína total presente nas diferentes frações celulares anteriormente preparadas tornou-se necessária para o cálculo da atividade enzimática específica. Para esse efeito, utilizou-se o método descrito por Lowry (284), o qual recorre à reação entre a ligação peptídica (-CO-NH-) e o sulfato de cobre em meio alcalino para gerar um complexo de cor azul. A reação entre os resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano) e o reagente de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico), catalisada por iões Cu^{2+} , a pH alcalino gera como produto final um complexo de heteromolibdénio que apresenta cor azul, que melhora a sensibilidade do método. Estes cromóforos podem ser doseados por espectrometria de absorção molecular ao comprimento de onda máximo de 720 nm.

A execução do método consistiu na preparação do reagente de Lowry, pela diluição de sulfato de cobre (1 %) e tartarato de sódio e potássio (2 %) em carbonato de sódio (2 %) (1:1:98), seguida da diluição da solução comercial de reagente de Folin-Ciocalteu em água destilada, na proporção de 1:1 em água ultrapura. A curva de calibração foi preparada no intervalo de 25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ recorrendo a uma solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A quantificação do teor proteico nas diferentes frações celulares exigiu a sua diluição prévia com NaOH (0,5 M) na proporção mais conveniente. A formação dos cromóforos foi conseguida pela adição de 5 mL de reagente de Lowry a 1 mL de solução padrão de BSA ou de amostra, seguida pela agitação em vórtex e de 10 min de incubação à temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se à mistura de reação 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, seguido de agitação no vórtex e de 30 min de incubação à temperatura ambiente. Após o tempo de repouso, leu-se a absorvência a 720 nm, sendo determinada a concentração de proteína nas diferentes frações celulares por interpolação gráfica na curva de calibração gerada com as soluções padrão de BSA.

3.3.3. Influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico em *S. cerevisiae*

Em meio adequado, os microrganismos encontram-se num estado de crescimento equilibrado, período durante o qual decorre duplicação da biomassa, acompanhada da duplicação de outras propriedades da população celular como o conteúdo em proteínas, DNA, RNA e água, mantendo uma constituição química constante (285). Uma cultura microbiana em crescimento equilibrado mimetiza uma reação autocatalítica de primeira ordem, na qual a velocidade de crescimento dos microrganismos num dado tempo é proporcional à massa de microrganismos presentes nesse instante. A constante de proporcionalidade k é um índice da velocidade de crescimento denominado constante de velocidade de crescimento (83). Métodos como a determinação do peso seco, da turbidez, bem como a avaliação da viabilidade celular de leveduras pela determinação do número de unidades formadoras de colónias (CFU) dão informação sobre o crescimento microbiano associado à divisão celular. Contudo, raramente o crescimento celular se mantém a velocidade constante durante um espaço de tempo alargado, encontrando-se esta restrição relacionada com a limitação de nutrientes disponíveis ou pela acumulação de produtos tóxicos ao metabolismo, conduzindo ao abrandamento do crescimento (83). A fosfatase alcalina é crucial para o metabolismo do fosfato e a sua especificidade e atividade é decisiva nos processos biológicos, uma vez que participa na rutura de ligações com potencial químico elevado, com libertação de fosfato inorgânico. O potencial químico disponibilizado poderá então ser utilizado pela célula na manutenção da homeostase do fosfato inorgânico (Pi), na síntese e degradação de polifosfatos, surgindo muitas vezes associado, a processos como proliferação, diferenciação, sinalização, migração e defesa celular, meiose, mitose, apoptose ou ainda na modulação do metabolismo dos ácidos nucleicos (126) (127) (128).

3.3.3.1. Cálculo da taxa específica de crescimento

A utilização da espectrometria de absorção molecular na determinação da turbidez de uma cultura microbiana é um dos poucos métodos disponíveis para monitorizar o crescimento celular. Assim, de forma a permitir a determinação da taxa específica de crescimento (μ) foram retiradas dos meios de cultura alíquotas aos tempos t_0 e t_{200} para leitura da turbidez a 640 nm. Os valores de turbidez_{640nm} permitiram

determinar o parâmetro μ (h^{-1}) para as diferentes condições de ensaio de acordo com a expressão matemática (83).

$$\mu = \frac{\ln(Gc) - \ln(Gt)}{(t - t_0)}$$

Gc - Turbidez_{640nm} t_0
 Gt - Turbidez_{640nm} t_{200}
 t - Tempo final (h)
 t_0 - Tempo inicial (h)

3.3.3.2. Determinação da viabilidade celular

A contagem de células em placas de agár é o método mais usado para medir a viabilidade de uma população celular, considerando que uma célula é viável quando mostra capacidade de reprodução formando uma colónia. As amostras foram retiradas em condições de assépsia aos tempos t_0 e t_{200} , adequadamente diluídas e posteriormente inoculadas em placa contendo meio YPD sólido e deixadas crescer a 28°C até não se observar o aparecimento de novas colónias. Após incubação procedeu-se á contagem das unidades formadoras de colónias (CFU), a qual permitiu determinar a viabilidade celular (%) de acordo com a expressão matemática (71) (286):

$$viabilidade (\%) = 100 - \left(\frac{N_c - N_t}{N_c} \right) * 100$$

N_c - culturas controlo log t_0
 N_t - culturas teste log t_{200}

3.3.3.3. Fosfatase alcalina

A atividade fosfatase alcalina foi determinada no sobrenadante TP acompanhando a hidrólise das ligações fosfoéster do substrato cromogéneo sintético p-nitrofenilfosfato (pNPP), pela leitura do incremento da absorvência a 405 nm devido à formação de p-nitrofenol (pNP), um dos produtos da reação (287). Assim, alíquotas da referida fração na diluição adequada de proteína (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubadas em células de absorção molecular contendo a mistura de reação constituída por pNPP (1,2 mM) em tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5. O branco utilizado para esta atividade consistiu na mesma mistura de reação à exceção da adição da amostra, sendo o seu volume compensado pela adição de tampão. O valor da atividade ALP foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares traçadas ao longo de 180 s a 37 °C e utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 16,03 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o pNPP.

3.3.4. Influência das condições de cultura no metabolismo energético de *S. cerevisiae*

O efeito Crabtree descreve um fenómeno alusivo ao crescimento respiratório de alguns tipos de leveduras como a *S. cerevisiae* o qual é inibido ou reprimido pela presença de hexoses, em particular da glicose, ocorrendo uma sobreposição da via fermentativa que inclui a glicólise e a fermentação alcoólica/láctica sobre a via respiratória. Em termos genéricos este efeito vulgarmente conhecido como efeito Crabtree e designado por alguns autores como efeito de Pasteur negativo é em muitos aspetos semelhante ao efeito Warburg descrito por Meyerhof e Warburg no início do século XX em células cancerígenas (48) (288) (33).

3.3.4.1. Hexocinase

Hexocinase é um enzima de baixa especificidade que catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para hexoses tais como D-glicose, D-manose e D-frutose, atuando nomeadamente como o primeiro enzima da glicólise ao catalisar a conversão de glicose em glicose-6-fosfato (139).

A atividade HXK foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bergmeyer, 1983 (289) a qual permitiu quantificar esta atividade de forma indireta recorrendo a duas reações enzimáticas acopladas. Assim, pela ação da HXK ocorre consumo de uma mol de moléculas de ATP e a glicose é convertida em glicose-6-fosfato a qual numa segunda reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase é convertida em gluconato-6-fosfato, acoplada à produção de NADPH o qual pode ser quantificado por espectrometria de absorção molecular.

Neste ensaio as reações decorreram em tampão trietanolamina (50 mM) pH 7,6 contendo glicose (5 mM); ATP (1 mM); NADP⁺ (0,05 mM); G6PD (0,3 U) e um volume adequado de sobrenadanteTP, na diluição adequada de proteína (80 µg/mL). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de reação substituindo o volume de amostra por igual volume de tampão trietanolamina.

O valor da atividade HXK foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares traçadas pelo incremento da absorvência a 340 nm, ao longo de 600 s, a 30 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ para o NADPH.

3.3.4.2. Piruvato cinase

O enzima piruvato cinase desempenha um papel crucial no consumo de glicose nos organismos respiratórios facultativos. Este enzima é um dos principais responsáveis pelo seu crescimento na ausência de oxigénio ao permitir a geração de ATP pela formação de piruvato, utilizando o fosfoenolpiruvato como substrato, conferindo assim autonomia de oxi-redução à glicólise (141). A atividade PYK foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Maitra, 1971 (290) e Bergmeyer, 1983 (289), de acordo com a qual a atividade piruvato cinase foi acoplada ao enzima lactato desidrogenase, permitindo desta forma que após a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato este possa ser convertido em lactato pela ação de lactato desidrogenase, utilizando o NADH como cofator.

Assim, a atividade PYK foi determinada na mistura de ensaio em tampão Tris-HCl (100 mM) pH 8,0 contendo fosfoenolpiruvato (1 mM); ADP (1 mM); frutose 1,6-difosfato (1mM); NADH (0,03 mM); lactato desidrogenase (0,3 U) e um volume adequado de sobrenadanteTP na diluição adequada de proteína (50 µg/mL). O branco utilizado para a determinação desta atividade consistiu na mesma mistura de reação substituindo a amostra por igual volume de água. O valor da atividade PK foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 600 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvência molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADH.

3.3.4.3. Piruvato descarboxilase

O enzima piruvato descarboxilase, localizado no citoplasma, promove a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetaldeído e apresenta-se sob a forma de um homotetrâmero com subunidades de 62 KDa de dimensão molecular.

A determinação da atividade enzimática PDC foi realizada de acordo com o método descrito por Bergmeyer, 1983 (289), de acordo com o qual o piruvato por ação do PDC foi convertido em dióxido de carbono e acetaldeído. A presença de álcool desidrogenase no meio de reação permitiu a conversão do acetaldeído a etanol acompanhada da oxidação de NADH.

Assim, a mistura de reação em tampão MES (0,5 M) pH 6,0 foi constituída por piruvato (30 mM); NADH (10mg/mL); ADH (10 U/mL) iniciando-se a reação pela adição de um volume adequado de sobrenadanteTP (50 µg/mL de proteína). O branco

foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio na ausência de amostra e repondo o seu volume por tampão MES.

O valor da atividade PDC foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 600 s, a 30 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADH.

3.3.4.4. Álcool desidrogenase

Álcool desidrogenase designa um grupo de enzimas de ocorrência ubíqua pertencentes à classe das oxi-redutases, as quais participam na interconversão de álcoois em aldeídos ou cetonas, processo que ocorre acoplado à redução de dinucleótido de adenina e nicotinamida (291) (292).

A determinação da atividade ADH foi realizada de acordo com o método descrito por Postma, 1989 (293). A mistura de reação em tampão Tris-HCl (0,5 M) pH 9,0 continha NAD^+ (40 mM) e um volume adequado de sobrenadanteTP (150 $\mu\text{g/mL}$ de proteína) e a reação enzimática foi iniciada pela adição de etanol (1M). O branco foi determinado pela substituição da amostra por tampão Tris-HCl. O valor da atividade ADH foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do incremento da absorvência a 340 nm, ao longo de 600 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADH.

3.3.4.5. Lactato desidrogenase

O enzima lactato desidrogenase citoplasmático, DLD3 endógeno de *S. cerevisiae* reconhece o piruvato como substrato, sendo a sua expressão reprimida pela presença de glicose no meio de cultura, refletindo na baixa produção de lactato nessas condições experimentais (95).

Esta atividade enzimática foi determinada recorrendo a alíquotas do sobrenadanteTP (concentração proteína 100 $\mu\text{g/mL}$) de acordo com o método proposto por Bergmeyer, 1983 (289) utilizando como meio de reação, tampão fosfato (0,1M) pH 7,0 contendo piruvato (0,05 mg/mL) e NADH (0,1 mg/mL). O branco foi constituído pela mesma mistura de ensaio substituindo o volume de amostra por tampão fosfato (0,1M) pH 7,0. O valor da atividade DLD foi calculado a partir do coeficiente angular

das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo de absorvência a 340 nm, ao longo de 180 s, a 25 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADH.

3.3.4.6. Citrato sintase

Citrato sintase é um dos enzimas reguladores do ciclo do citrato que participa na condensação do oxaloacetato com o acetil-CoA proveniente da descarboxilação oxidativa do piruvato, mediada pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase, em leveduras crescidas na presença de glicose.

A atividade CS foi determinada em tampão Tris-HCl (100 mM) pH 8,0 contendo; acetil-CoA (0,1 mM); oxaloacetato (0,2 mM), um volume adequado de fração rica em mitocondrios correspondente ao sedimento Tris-sacarose (concentração proteína $50 \mu\text{g/mL}$) e ácido 5,5'-ditiodi-2-nitrobenzoico (reagente de Ellman) (0,25 mM) (294). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio substituindo o volume de amostra por tampão (100 mM) pH 8,0. A dependência da reação do oxaloacetato também foi confirmada.

O valor da atividade CS foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do aumento da absorvência a 412 nm ao longo de 300 s, a 25 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $14,14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^-).

3.3.4.7. Succinato desidrogenase

O enzima succinato desidrogenase intervém no ciclo do citrato e na cadeia respiratória, catalisando a oxidação do succinato a fumarato, acoplada à redução do coenzima FAD a FADH_2 (162).

A atividade específica succinato desidrogenase (SDH) do sedimento Tris-sacarose foi medida indiretamente através do aumento da absorção do citocromo c reduzido. As amostras (proteína $20 \mu\text{g/mL}$) foram incubadas em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 contendo citocromo c (100 mM); cianeto de potássio (1 mM); succinato (2,5 mM) (295). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio substituindo a amostra por igual volume de tampão fosfato. O valor da atividade SDH foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela

leitura do incremento da absorvência a 550 nm ao longo de 600 s a 25 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvência molar de 19,0 mM⁻¹cm⁻¹.

3.3.4.8. NADH ubiquinona desidrogenase I

S.cerevisiae não apresenta complexo I na cadeia respiratória, pelo que dispõe de 3 NADH desidrogenases localizadas na membrana interna mitocondrial. Assim, os equivalentes redutores sob a forma de NADH gerados no citoplasma são oxidados pela NADH ubiquinona oxidorreduzases também denominadas NADH desidrogenases externas (NDE1).

A atividade NADH ubiquinona desidrogenase foi determinada no sedimento Tris-sacarose em tampão fosfato (10 mM) pH 7,5 contendo KCN (100 µM); citocromo c (22,5 µM) e um volume adequado de fração rica em mitocondrios (80 µg/mL de proteína) a 30 °C na presença de NADH (0,5 mM), de acordo com Tzagoloff, 1971 (283) e Ludovico, 2002 (296). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio substituindo a amostra por igual volume de tampão fosfato. O valor da atividade NDE1 foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do incremento da absorvência a 550 nm, ao longo de 180 s, a 30 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvência molar de 21 mM⁻¹ cm⁻¹ para a forma ferrosa do citocromo c.

3.3.4.9. Malato desidrogenase

Os enzimas MAE1 e MDH1, mitocondriais e MDH3, peroxissomal, que catalisam a interconversão dependente de NAD(P)H do malato em oxaloacetato ou em piruvato ao nível do ciclo do citrato parecem ser vitais para assegurar o crescimento de *S. cerevisiae* quando esta metaboliza acetato como fonte de carbono (175)(176). O isoenzima MDH1 faz parte do mecanismo de transporte de equivalentes redutores sob a forma de NADH que regula a razão NAD⁺/NADH no citoplasma e no mitocondrio (175). No citoplasma podemos encontrar os isoenzimas MDH2 que fazem a conversão do oxaloacetato em piruvato com formação de NADPH, usado na biossíntese de lípidos (171) (88) (174).

A determinação da atividade do enzima malato desidrogenase (MDH1, MDH3, MAE1) decorreu em tampão Tris-HCl (0,1 M) pH 7 contendo MgCl₂ (1 mM), NH₃ (1 mM), KCl (1 mM), ácido málico (10 mM) e sedimentoTP (50 µg/mL de proteína) na diluição adequada, sendo a reação iniciada pela adição de NAD⁺ (1,35 mM). A

determinação da atividade do enzima malato desidrogenase citoplasmático (MDH2) presente no citoplasma foi realizada na fração sobrenadante nTP (150 µg/mL de proteína) iniciando-se a reação pela adição de NADP⁺ (1mM) (196).

O valor da atividade malato desidrogenase foi calculada a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do incremento da absorvência a 340 nm, a 30 °C, ao longo de 300 s e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹.

3.3.4.10. Glicose-6-fosfato desidrogenase

A via das pentoses fosfato constitui uma das principais fontes de NADPH utilizado na neutralização de ROS, em reações biossintéticas redutoras e na produção de intermediários metabólicos. Desta forma, o enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima regulador da via das pentoses fosfato, é uma proteína filogeneticamente conservada que catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona, uma reação modulada retroativamente pela razão NADPH/ NADP⁺ (297).

Esta atividade enzimática foi determinada recorrendo a alíquotas do sobrenadante pós 12000 g (concentração proteína 150 µg/mL) de acordo com o método proposto por (293) e (289) utilizando como meio de reação solução tampão Tris-HCl (50 mM) pH 8,0 contendo NADP⁺ (0,4 µM), MgCl₂ (5 mM). A reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato (5 mM), após estabilização a 37 °C durante 60 s. Os valores de absorvência foram registados contra um branco constituído pela mistura de reação e substituindo a amostra por igual volume de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,0.

O valor da atividade G6PD foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do incremento da absorvência a 340 nm, ao longo de 180 s e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ para o NADPH.

3.3.5. Influência das condições de cultura na capacidade antioxidante de *S. cerevisiae*

A produção de espécies reativas de oxigénio encontra-se intimamente relacionada com o metabolismo aeróbio e como tal os organismos vivos desenvolveram mecanismos antioxidantes associados a esse processo capazes de neutralizar os efeitos deletérios das ROS. A resposta enzimática constitui uma linha de defesa primária que

atua sobre as ROS promovendo, por exemplo, a dismutação do radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio, o qual pode ser reduzido a água pelos enzimas catalase e glutatióno peroxidase. O glutatióno é capaz de capturar ROS pela conversão do seu grupo sulfidrílo em dissulfureto de glutatióno, desempenhando assim um papel de relevo nas linhas de defesa não enzimáticas. A reciclagem deste tripéptido é garantida pelo ciclo do glutatióno que envolve os enzimas glutatióno peroxidase e glutatióno redutase, auxiliado pelo enzima glicose-6-fosfato desidrogenase que disponibiliza equivalentes redutores para o funcionamento do ciclo.

3.3.5.1. Glutatióno redutase

Glutatióno redutase encontra-se diretamente envolvido no ciclo do glutatióno, reduzindo o dissulfureto de glutatióno (GSSG) à sua forma tiólica (GSH), na presença de NADPH (298).

A sua atividade específica foi determinada no sobrenadante TP, seguindo o método descrito por Goldberg (299). Neste método, a mistura de reação era constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, EDTA (0,5 mM), GSSG (2 mM) e amostra (concentração proteína 150 µg/mL), incubada durante 5 min a 37 °C. A reação foi então iniciada com adição de NADPH (0,15 mM), lendo-se a absorvência contra o branco, onde a amostra foi substituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,0.

O valor da atividade GR foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 300 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ para o NADPH.

3.3.5.2. Glutatióno peroxidase

O enzima GPx, outro membro do ciclo do glutatióno, desempenha um papel crucial na resposta antioxidante, pela capacidade que tem para reduzir lipoperóxidos e/ou o peróxido de hidrogénio a alcoóis ou água, acoplada à conversão de glutatióno em dissulfureto de glutatióno.

A atividade glutatióno peroxidase foi determinada de acordo com o protocolo proposto por (300). A mistura de reação constituída por tampão fosfato (70 mM) pH 7,2, GSH (500 µM), GR (12 mU), NADPH (160 mM) e volume adequado de sobrenadanteTP (concentração proteína 150 µg/mL) a qual foi incubada durante 10 min

a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de *ter*-butilhidroperóxido (100 µM) e monitorizada pela leitura, em contínuo, da absorvência a 340 nm contra um branco com composição semelhante, onde o volume de amostra foi substituído por tampão fosfato (70 mM) pH 7,0.

O valor da atividade GPx foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 180 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ para o NADPH.

3.3.5.3. Superóxido dismutase

Os enzimas superóxido dismutase catalisam a conversão do radical anião superóxido (O₂^{•-}) em peróxido de hidrogénio e dióxigénio. Os enzimas Cu/ZnSOD são os principais responsáveis pela remoção do anião superóxido do citoplasma e possivelmente dos peroxissomas. Por outro lado, os enzimas MnSOD protegem maioritariamente o mitocôndrio do radical superóxido gerado pelo metabolismo respiratório.

A determinação desta atividade enzimática foi realizada de acordo com o método descrito por Oberley, 1984 (301) recorrendo ao sistema xantina/NBT no qual o radical anião superóxido foi gerado pela conversão de xantina em ácido úrico e peróxido de hidrogénio, na presença de dióxigénio e de xantina-oxidase. A quantificação do produto cromogénico NBT-diformazano resultante da redução do sal azul de tetrazólio (NBT), pelo radical anião superóxido, proveniente da ação da xantina oxidase, permitiu de forma indireta, a determinação da atividade enzimática uma vez que o enzima SOD, presente na amostra, compete com o NBT na oxidação do radical anião superóxido, diminuindo a taxa de formação do cromóforo.

Assim, a determinação da atividade SOD foi realizada numa mistura de reação em tampão fosfato (35 mM) pH 7,8 contendo EDTA (0,1 mM), NBT (30 µM); BSA (0,5 %); xantina (0,1 mM); xantina oxidase (0,1 mU/mL) e amostra (sobrenadante TP ou sedimento TP, 200 ou 150 µg/mL de proteína respetivamente). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio substituindo a amostra por tampão fosfato.

A atividade SOD presente na amostra foi calculada pela percentagem de inibição da taxa de formação de NBT-diformazano a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 560 nm, ao longo

de 300 s, a 25 °C, considerando que 1U corresponde à quantidade de enzima presente na amostra que causou 50% de inibição da taxa de redução do sal azul de tetrazólio.

3.3.5.4. Catalase

Os enzimas catalase pertencentes à subclasse das oxidoredutases apresentam distribuição ubíqua pelos seres vivos e possuem como principal função decompor o peróxido de hidrogénio em água e dióxigénio. Em *S. cerevisiae* podem ser detetadas duas isoformas, a CTT1 de localização citoplasmática e a CTA1 de localização peroxissomal.

A determinação desta atividade catalítica fez-se segundo o método desenvolvido por Beers, 1952 (302), acompanhando-se a degradação do H₂O₂ pelos enzimas CTA1 e CTT1, pelo registo da variação de absorvência a 240 nm, a 25 °C durante 120 s, contra um branco constituído pelo meio de reação onde foi substituído o volume de amostra por igual volume de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. Utilizou-se em cada caso alíquotas de sobrenadanteTP (CTT1) ou sedimentoTP (CTA1) com concentração aproximada de proteínas de 150 mg/mL e 70 mg/mL, respetivamente, em meio de reação composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H₂O₂ (30 mM).

O valor da atividade catalase foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 0,0435 mM⁻¹.cm⁻¹ para o H₂O₂.

3.3.5.5. Glutationo e dissulfureto de glutaciono

O tripéptido γ -glutamil-l-cisteinilglicina (GSH) é composto, como a sua designação sugere, pelos resíduos de aminoácidos glutamato, glicina e cisteína, onde este possui um grupo sulfidrílo que se comporta como nucleófilo e redutor. Nesse contexto cumpre um papel fundamental ao nível das defesas antioxidantes celulares, encontrando-se presente na célula em níveis de concentração citoplasmática, nuclear e mitocondrial elevada, prevenindo a ocorrência de danos causados pelas ROS. O glutaciono enquanto doador de eletrões converte-se em dissulfureto de glutaciono quando manifesta a sua ação como antioxidante. Como descrito anteriormente, o GSH pode ser regenerado a partir do GSSG pelo enzima glutaciono redutase que catalisa uma reação dependente do NADPH gerado pela via das pentoses fosfato.

Desta forma a razão GSH/GSSG e o conteúdo em tióis totais não proteicos (GSH + GSSG) são considerados por diversos autores como bons parâmetros de avaliação do

estado redox da célula, nomeadamente quando contatam com agentes de *stress*. Desta forma, uma relação GSH/GSSG elevada ($\approx 1,2$ em leveduras), favorece um ambiente redox celular adequado (303).

O método utilizado na determinação do GSH foi descrito por Hissin, 1976 (304) recorrendo ao OPT para desenvolver um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência. Para tal, foi preparada uma mistura de reação com alíquotas de sobrenadanteTP, na diluição adequada à qual se adicionou padrão (GSH) ou tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, no caso do branco, tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 com EDTA (0,005 M) e OPT na proporção de 1:30:2. A mistura foi agitada e incubada durante 15 min à temperatura ambiente, procedendo-se à posterior leitura de fluorescência a λ_{exc} 350 nm e ao λ_{em} 420 nm.

A concentração em GSH, por grama de peso seco, no sobrenadanteTP das amostras, foi determinada por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente construída com padrões de GSH, para o intervalo de concentração 0-100 μ M.

Na quantificação do GSSG foi utilizado o método de Carru, 2003 (305), utilizando alíquotas de sobrenadanteTP, na diluição adequada, que foram incubadas durante 30 min com NEM (20 μ M) para sequestrar o GSH endógeno. Fez-se reagir esta mistura com OPT comercial e NaOH (0,1 M) na proporção 1:1:18, à temperatura ambiente, durante 15 min. A potência de fluorescência lida a λ_{exc} 350 nm e a λ_{em} 420 nm foi utilizada para calcular a concentração em GSSG, por g de peso seco, na fração sobrenadante pós 12000 g, por interpolação gráfica em curva de calibração previamente construída utilizando padrões de GSSG no intervalo de concentração 0-80 μ M.

3.3.5.6. Espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio são subprodutos normais do metabolismo celular, nomeadamente ao nível da cadeia respiratória mitocondrial. Contudo, quando os seus níveis se sobrepõem aos níveis dos sistemas de defesa, podem levar à formação de danos ao nível de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e outros componentes celulares, podendo em casos extremos levar à morte da célula (306).

O conteúdo em ROS na amostra foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel, 1992 (307) que utiliza o 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH) que na presença de peróxido de hidrogénio é rapidamente oxidada a DCF que

apresenta fluorescência elevada, permitindo assim estimar os níveis de peróxido de hidrogénio. Fez-se reagir alíquotas do sobrenadanteTP com 2 mL de solução DCFH (25 μM) preparada em tampão fosfato (1 mM) pH 7, 4 e tampão Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 na proporção 1:40, durante 10 min, a 37 °C, após o que se leu a potência de fluorescência da mistura a $\lambda_{\text{exc}}488\text{nm}$ e a $\lambda_{\text{em}}525\text{nm}$. Preparou-se ainda uma curva de calibração com peróxido de hidrogénio no intervalo de 0-400 μM que permitiu calcular por interpolação gráfica a quantidade de ROS presente nas amostras.

3.3.5.7. Peroxidação lipídica

A interacção das espécies reativas de oxigénio com a célula pode despoletar a peroxidação lipídica, provocando a deterioração direta da membrana celular, devido à rutura oxidativa da cadeia carbonada dos resíduos acilo polinsaturados da membrana, culminando na formação de aldeídos como o malonaldeído (MDA), um produto extremamente reativo. Assim, o conteúdo intracelular de MDA é frequentemente utilizado como marcador de danos oxidativos na célula (308).

Na determinação do conteúdo em MDA utilizou-se o método descrito por Ohkawa, 1979 (309) . Este método baseia-se na reação do MDA, presente na amostra, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O produto desta reação emite fluorescência podendo desta forma detetar-se o teor de MDA por espectrometria de fluorescência.

Utilizando volume adequado de amostra, sobrenadanteTP, preparou-se um meio de reação com SDS (8,1%), TBA (0,4%) em tampão acetato (10%) pH 3,5 (1:2:30). Esta mistura foi deixada a incubar durante 60 min em banho a 95°C com agitação constante, seguindo-se um período de 15 min de arrefecimento em gelo que conduziu à paragem da reação. Após arrefecimento foi adicionado n-butanol (1:1) seguido de agitação em vórtex. Aguardou-se a separação de fases centrifugando a mistura a 1600 g durante 10 min, após 60 min de repouso. Procedeu à recolha da fase orgânica que foi posteriormente utilizada na determinação da potência de fluorescência a $\lambda_{\text{exc}}515\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}553\text{nm}$. O branco foi preparado com mesma mistura de reação substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7. A concentração de MDA na amostra foi determinada por interpolação em curva de calibração gerada com soluções padrão de MDA (2,5 a 100 μM), obtido por hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em meio ácido, sujeitas às mesmas condições de ensaio (308).

3.3.6. Análise estatística dos resultados

Os resultados experimentais em bioquímica podem apresentar dispersão elevada devido à grande variabilidade dos modelos biológicos. A credibilização desses resultados exige sempre a aplicação de métodos de análise estatística adequados aos ensaios executados. A sua escolha depende da dimensão da amostra (n), uma vez que a incerteza dos resultados é inversamente proporcional à sua dimensão e depende da quantidade de ensaios controlo e de tratamentos realizados. Neste estudo, optou-se por realizar cinco experiências independentes para cada controlo ou tratamento realizado ($n = 5$), previamente descritos no ponto 3.3.1, procurando-se minimizar o número de fatores de variabilidade associado a cada ensaio.

Em geral, os resultados obtidos com modelos biológicos seguem, na maior parte dos casos, uma distribuição de probabilidade gaussiana que corresponde a uma curva contínua, simétrica em forma de sino, caracterizada por dois parâmetros: a abcissa do máximo dessa curva, designada por média aritmética (μ) e a distância da média ao ponto de inflexão dessa curva que se designa por desvio padrão (σ).

Embora o número de réplicas (5) seja inferior ao ideal admitido pela estatística dos grandes números, cujo volume de trabalho e custos operacionais seriam incomportáveis em Bioquímica, a validade estatística da análise aqui efetuada socorreu-se do corolário do teorema do limite central que diz: as médias das amostras de uma população com distribuição gaussiana terão também uma distribuição gaussiana, qualquer que seja a dimensão (n) da amostra. O referido teorema postula ainda que à medida que a dimensão aumenta, as suas medidas aproximam-se estreitamente da distribuição gaussiana independentemente da distribuição da população, ou seja, mesmo quando a distribuição dos dados individuais não é gaussiana. (310) (311) (312).

A análise de variância desenvolvida por Fischer tem como principal alvo testar se a média estatística de duas ou mais amostras provêm de populações com a mesma média paramétrica. Embora a determinação de diferenças significativas entre duas amostras, possa ser realizada com recurso ao teste t , a mesma abordagem para um número elevado de amostras exige que seja efetuada análise de variância simples ANOVA I, um teste estatístico mais adequado (310) (313) (312).

Em qualquer análise de variância, compara-se sempre a amostras ou grupos de n replicados, podendo sempre obter-se estimativas da variância da população a partir da soma dos quadrados de cada grupo utilizando a expressão:

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (x_{1j} - \bar{x}_1)^2$$

Contudo pode-se realizar uma melhor estatística da variância, recorrendo ao cálculo da média pesada da variância, vulgarmente designada por variância no interior dos grupos, utilizando a expressão geral em que a variância de cada amostra s_i^2 é afetada pelos graus de liberdade $df = n_i - 1$:

$$\frac{1}{a(n-1)} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{j=n} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

Este termo estima a dispersão em cada grupo individualmente, sendo assumido que todos os grupos se comportam como igualmente variáveis e engloba a variação em todos eles (310) (313) (312).

Uma segunda estimativa da população pode igualmente ser calculada eliminando as próprias fronteiras entre os grupos, vulgarmente designada por variância entre grupos, tratando as médias \bar{x} dos a grupos, como se fossem a observações de uma amostra. Esta segunda estatística não está tão próxima do valor tomado com verdadeiro, como a estatística anterior baseada na variância da média dentro dos grupos, sendo um estimador independente da variância paramétrica σ^2 . A variância entre grupos que estima essencialmente a dispersão das médias entre os grupos pode então ser calculada para $a-1$ graus de liberdade por (310) (313) (312):

$$\frac{1}{a-1} \sum_{i=1}^{i=a} n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$$

O conhecimento destes dois estimadores independentes da variância permite-nos testar se, de facto, estimam o mesmo parâmetro ou não. Para esse efeito utiliza-se a função de distribuição F. Ao efectuar-se uma amostragem onde se registam n_1

replicados da amostra 1 e se calcula a sua variância s_1^2 , n_2 replicados da amostra 2 e se calcula a sua variância s_2^2 , mesmo quando a dimensão da amostra 1 é diferente da dimensão da amostra 2, o quociente:

$$F_s = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

deverá ser próximo de 1, se as variâncias estatísticas estimarem o mesmo parâmetro. A função de distribuição F é uma curva de probabilidade teórica onde o quociente das variâncias das amostras s_1^2/s_2^2 constituem estimadores estatísticos que podem ou não seguir uma distribuição F. Quando o nº de graus de liberdade é muito baixo a distribuição assume a forma de L, mas à medida que esse valor aumenta a distribuição passa a descrever uma curva com um máximo deslocado para a direita. As tabelas da distribuição F, apresentam assim a função de distribuição cumulativa para vários valores de probabilidade selecionados (310) (312) (313).

Ao testar-se a hipótese nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots \dots = \mu_n$, determinou-se por interpolação, o valor crítico da tabela correspondente ao número de graus de liberdade respetivo, para o nível de confiança de 99%, na maior parte das situações e 95% em alguns casos. Calculou-se então o valor de F estatístico que nesta situação correspondeu ao quociente da variância entre grupos pela variância no interior dos grupos. Quando o valor de F estatístico era superior ao valor crítico da tabela, rejeitou-se a hipótese nula de as médias dos grupos estimarem populações idênticas, concluindo-se que existiam diferenças entre eles. Caso contrário as diferenças observadas não puderam ser consideradas estatisticamente significativas e aceitou-se a hipótese nula. Sempre que o teste F permitiu detetar diferenças significativas, passou-se a uma segunda fase da análise de variância onde se procurou discriminar os grupos que diferem entre si. Caso contrário, não se prosseguiu com a análise estatística, uma vez que não se detetaram diferenças entre os diferentes grupos da população. No segundo estágio, a média estatística de cada grupo foi comparada com a média estatística dos outros grupos utilizando o teste de Duncan, derivado do teste t. A sua aplicação fez sentido porque se procurou avaliar se os tratamentos fixos efectuados contribuíram para as diferenças observadas entre os grupos (310) (313) (312).

Existem muitos processos alternativos de comparações médias de tratamentos testados numa experiência, vulgarmente descritos por comparação de pares ou comparação de grupos. Quando o número total de tratamentos é elevado, como foi este

caso, é recomendada a aplicação do teste de Duncan como mais adequada. O procedimento envolveu o cálculo de fronteiras numéricas ou intervalos de confiança que permitem considerar como significativas ou não as diferenças observadas entre quaisquer médias de tratamentos (313). A concretização do processo passou pela ordenação das médias estatísticas de todos os tratamentos por ordem decrescente do seu valor e pelo cálculo do desvio padrão da média $S_{\bar{a}}$ utilizando a equação:

$$S_{\bar{a}} = \sqrt{\frac{2 s^2}{n}}$$

Posteriormente, calcularam-se $(a-1)$ intervalos de confiança R_p pela expressão:

$$R_p = \frac{(r_p)(s_{\bar{a}})}{\sqrt{2}} \quad \text{Para } p = 2, 3 \dots a$$

onde a representa o número total de tratamentos, $S_{\bar{a}}$ o desvio padrão da média das médias já calculados e r_p diz respeito ao valor tabelado dos intervalos de confiança da distribuição t-student, dependentes da posição de ordenação p de cada média estatística e de $(n-1)$ graus de liberdade. Uma vez calculados os valores de R_p , calculou-se a diferença entre a média estatística mais elevada e o valor de R_p , ou seja o valor de R_p com $p = t$ que foi comparado com os valores de outras médias estatísticas. Quando as médias estatísticas eram inferiores a essa diferença, considerou-se significativamente diferentes da média estatística mais elevada (313). Seguidamente repetiram-se os passos anteriores, calculando-se uma nova diferença com os valores de R_p e das médias dos tratamentos remanescentes e procedeu-se como anteriormente. O processo repetiu-se até comparar todos os pares de grupos em estudo (313).

Neste trabalho, os resultados para cada tratamento são apresentados de forma gráfica, para facilitar a sua leitura. As representações adotadas correspondem a linhas em escala aritmética ou barras. Relativamente aos gráficos de barras, a sua espessura é arbitrária, mas o seu comprimento é proporcional ao valor absoluto da variável que representa como recomendado por Sokal e Rohlf (310). Os elementos presentes em cada gráfico são o título, a legenda explicativa da natureza e origem dos resultados. Como estatística de localização utilizou-se a média aritmética e como medida de dispersão de

resultados utilizou-se o desvio padrão da média (SEM) por ser encarado como um indicador de viabilidade expectável da média das amostras. Em acréscimo, o desvio padrão da média, resultou do quociente entre o desvio padrão e \sqrt{n} , sendo por isso uma medida do afastamento das médias dos valores das amostras relativamente à média da população que nunca ultrapassa o desvio padrão (310) (312).

Os cálculos e representações gráficas foram realizados utilizando os programas Excel 2010 e SPSS 22 para o Windows, licenciados pela Microsoft para a Universidade de Évora.

3.4. Equipamento

Autoclave da marca Uniclave, modelo 5S

Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200

Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205

Banho de ultra-sons Sonorex RK100

Banho termostaticado com agitação marca Memmert, modelo 3200 R

Câmara de ultra congelação da marca New Brunswick scientific, modelo U6785

Centrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K

Equipamento para obtenção de água ultra pura da marca Barnstead, modelo easy pure UV/UF

Espetrómetro de absorção molecular da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10

Espetrómetro de absorção molecular de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho de circulação de água da Grant.

Espetrómetro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC

Estufa WTC binder

Estufa incubadora marca Memmert

Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450

Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34

Potenciômetro da marca Metrohm, modelo 691

Vórtex da marca Wisemix, modelo VN10

3.5. Reagentes

1,1,3,3-tetrametoxipropano, 99%, Sigma, St. Louis
1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, $\geq 99\%$, Sigma, St. Louis
Acetil-CoA, Sigma, St. Louis
Ácido acético (10%), MERCK, Darmstadt
Ácido clorídrico, pró-análise ($d = 1,19$) 37%, MERCK, Darmstadt
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (sal dissódico), 99% Sigma, St. Louis
Ácido gálico, $\geq 98\%$ MERCK, Darmstadt
Ácido linoleico, $\geq 99\%$ Sigma, St. Louis
Ácido málico, 99% Sigma, St. Louis
Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
Adenosina difosfato (ADP), $\geq 95\%$, Sigma, St. Louis
Adenosina trifosfato (ATP), $\geq 99\%$, Sigma, St. Louis
Albumina de soro bovino (BSA), $\geq 95\%$, Sigma, St. Louis
Álcool desidrogenase (ADH), ≥ 300 units/mg protein, Sigma, St. Louis
Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
Cianeto de potássio, $\geq 97\%$, Sigma, St. Louis
Citocromo c, $\geq 95\%$, Sigma, St. Louis
Cloreto de magnésio, 99%, Sigma, St. Louis
Cloreto de magnésio hexahidratado, 99%, Sigma, St. Louis
Cloreto de potássio (KCl), $\geq 99\%$, Sigma, St. Louis
Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
Dissulfureto de glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
Duodecilssulfato de sódio, 99,0%, Sigma, St. Louis
Etanol, pró-análise ($d = 0,79$) 99,8%, MERCK, Darmstadt
Extrato de levedura, resíduos $< 15\%$, Sigma, St. Louis
Fosfoenolpiruvato, 99,0%, Sigma, St. Louis
Frutose 1,6-difosfato, $\geq 98\%$ Sigma, St. Louis
Glicerol, $\geq 99\%$, MERCK, Darmstadt
Glicilglicina, 98,0%, MERCK, Darmstadt
Glicose-6-fosfato desidrogenase, $\geq 95\%$, Sigma, St. Louis
Glicose, 99,5 %, Sigma, St. Louis

Glutationo redutase, 99,9 %, Sigma, St. Louis
Glutationo reduzido, 98 %, Sigma, St. Louis
Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
Hidrogenofosfato de dipotássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
Lactato desidrogenase, 95%, Sigma, St. Louis
Nanopartículas de dióxido de titânio <100 nm, 99.7%, Sigma, St. Louis
Nanopartículas de dióxido de titânio <25 nm, 99.7%, Sigma, St. Louis
n-butanol, 99%, Sigma, St. Louis
N-etilmaleimida, 97,0%, Sigma, St. Louis
Nicotinamida adenina dinucleotídeo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
Nicotinamida adenina dinucleotídeo, pró-análise, 97,0 %, Sigma, St. Louis
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
o-ftaldeído, 99%, St. Louis
Oxaloacetato, 97,0 %, Sigma, St. Louis
Peptona, impureza $\leq 15\%$, Sigma, St. Louis
Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30%, Sigma, St. Louis
Piruvato, 99%, Sigma, St. Louis
p-nitrofenilfosfato, Sigma, St. Louis
Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis
Succinato, 98 %, Sigma, St. Louis
Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5 %, MERCK, Darmstadt
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
t-butilidroperóxido, Sigma, St. Louis
Tris-(hidroximetil)-aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
Tween 20, pro-análise, MERCK, Darmstadt
Xantina oxidase, 10-25% proteína, Sigma, St. Louis
Xantina, $\geq 99\%$, Sigma, St. Louis

4. Resultados e discussão

A competição entre a glicólise e a fosforilação oxidativa para o ADP e Pi com ocorrência de défice respiratório, acidificação citoplasmática seguido pela inibição de enzimas oxidativos constituem algumas das alterações do metabolismo celular de leveduras, moduladas pela glicose, como *S. cerevisiae*, classificada Crabtree positiva. Em termos genéricos este efeito vulgarmente conhecido como efeito Crabtree é designado por alguns autores como efeito de Pasteur negativo e é em muitos aspetos semelhante ao efeito Warburg descrito por Meyerhof e Warburg no início do século XX em células cancerígenas (48) (288). As referidas alterações metabólicas facilitam a sobrevivência das células cancerígenas em condições de hipóxia e por esse motivo têm sido frequentemente utilizadas no prognóstico e terapia dirigida do cancro (37).

Neste estudo procurou-se induzir o efeito de Crabtree em *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPG pela adição de glicose (2%), meio YPGD, de forma a permitir avaliar um eventual efeito modulador por TiO₂-NP neste desvio metabólico. Nesta aproximação experimental foram utilizadas TiO₂-NP com diferente dimensão molecular (<25 e <100nm), apensadas à cultura de *S. cerevisiae* 100 min após a adição de glicose ou em simultâneo com o acréscimo deste glúcido e mantendo as condições de agitação (180 rpm) e temperatura (28 °C) ou ainda aplicando choque térmico (HS) pela elevação da temperatura da cultura para os 40 °C (Figura 3.1).

A leitura e discussão dos resultados decorreram em 3 momentos onde se avaliou a influência das condições de cultura na (o): *i*) taxa específica de crescimento, viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico, *ii*) metabolismo energético e *iii*) capacidade antioxidante de *S. cerevisiae*.

Em cada momento procurou-se avaliar se a adição de glicose (YPGD) foi suficiente para induzir a fermentação aeróbia como descrito no efeito de Crabtree. Ultrapassado este primeiro passo do estudo procurou-se avaliar numa primeira fase se a adição de TiO₂-NP de diferente dimensão molecular, 100 min após a indução do efeito Crabtree (ensaio A), sujeitas ou não a HS tiveram capacidade para reverter esse efeito. Numa segunda fase avaliou-se ainda se a adição simultânea de glicose e TiO₂-NP de diferentes tamanhos (ensaio B), em condições de HS ou não, conseguiram evitar a evolução para fermentação aeróbia determinada pela presença da glicose no meio de cultura.

4.1. Influência das condições de cultura na taxa específica de crescimento, viabilidade e disponibilidade de fosfato inorgânico em *Saccharomyces cerevisiae*

A Figura 4.1 revela que *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPG exibiam taxa específica de crescimento (μ) aproximadamente igual a 0,25 h⁻¹, um valor característico de *S.cerevisiae* respiratórias, enquanto que as células crescidas em meio YPGD apresentavam $\mu \sim 0,40$ h⁻¹, valor descrito para células respiratório-fermentativas, comum a situações onde foi induzido o efeito de Crabtree (314) (67).

A referida Figura mostra também que células crescidas durante 200 min na presença de glicose e expostas nos últimos 100 min a TiO₂-NP (ensaio A), sem ou com choque térmico apresentavam μ idênticos aos valores obtidos para células respiratório-fermentativas. Os valores de μ obtidos, neste ensaio, para células expostas a choque térmico, na ausência ou na presença de TiO₂-NP, não diferiam significativamente entre si ($p < 0,01$).

No ensaio B podemos observar que células crescidas durante 200 min na presença de glicose e TiO₂-NP <25 nm, na ausência ou na presença de choque térmico, apresentavam valores de μ estatisticamente idênticos aos de células respiratórias. Resposta idêntica foi também observada para células expostas durante o mesmo período de tempo a TiO₂-NP <100 nm e choque térmico. O choque térmico ou a exposição a TiO₂-NP <100 nm sem choque térmico não induziram diferenças significativas ($p < 0,01$) no parâmetro μ , relativamente às células respiratório-fermentativas.

Estes resultados sugerem que no ensaio B, a presença de TiO₂-NP de qualquer dimensão e o choque térmico modificaram a taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ de respiratório-fermentativas para respiratórias. Na ausência de HS apenas as TiO₂-NP de menor dimensão (<25 nm) exerceram efeito similar. Esta primeira aproximação permite inferir que as nanopartículas de menor dimensão, *per si*, exerceram uma ação moduladora negativa, podendo evitar a manifestação do efeito Crabtree quando o tempo de exposição é de 200 min, em simultâneo com a adição de glicose.

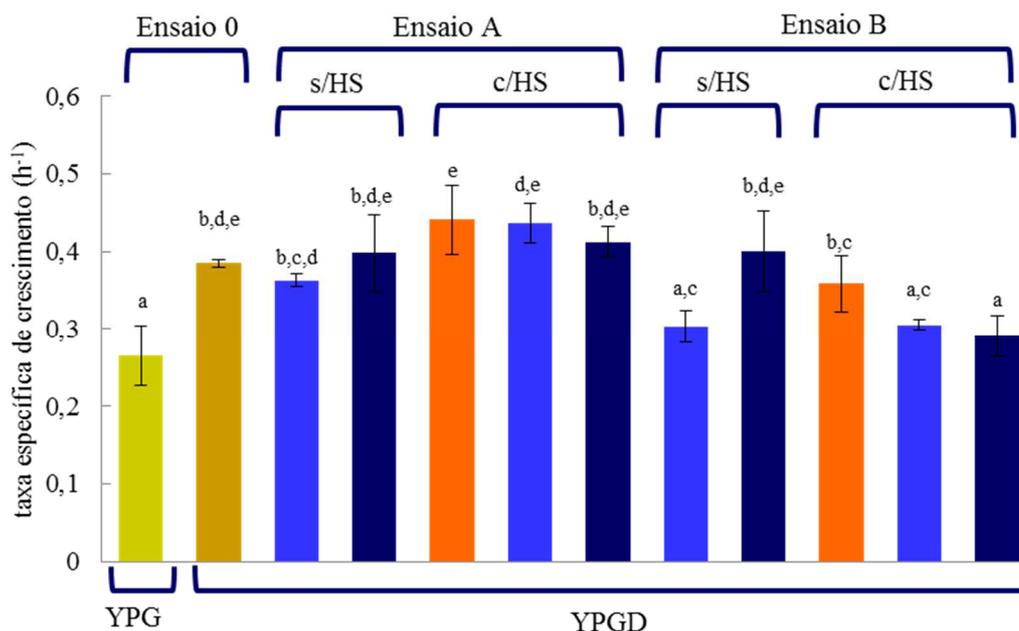


Figura 4.1 Taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de TiO₂-NP ■ e na presença de TiO₂-NP <25 nm ■ ou TiO₂-NP <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A Figura 4.2 representa a viabilidade celular em cada um dos ensaios desenvolvidos neste estudo. A presença de glicose no meio de cultura induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) da viabilidade celular, compatível com o descrito na literatura para células respiratório-fermentativas (306).

A partir da mesma Figura pode observar-se que células crescidas durante 200 min na presença de glicose e expostas nos últimos 100 min a TiO₂-NP <25 nm (ensaio A), sem choque térmico apresentavam viabilidade celular estatisticamente semelhante ($p < 0,01$) à de células crescidas em meio YPGD. No entanto, a aplicação do mesmo tratamento a TiO₂-NP <100 nm, induziu um decréscimo da viabilidade celular para valores idênticos aos das células crescidas em meio YPG. Uma resposta idêntica pode ser observada em células sujeitas a choque térmico e TiO₂-NP <25. A aplicação do choque térmico a células expostas nos últimos 100 min da cultura a TiO₂-NP <100 provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) deste parâmetro relativamente a qualquer dos controlos.

O perfil de resposta obtido com *S. cerevisiae* tratadas durante 200 min (ensaio B) mostra um decréscimo de viabilidade celular em células cultivadas na presença de TiO₂-NP <25 e <100 nm para valores idênticos aos de células respiratórias, no caso de TiO₂-

NP de maior dimensão, e para níveis inferiores com $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$. No que diz respeito ao choque térmico observou-se em qualquer das culturas um decréscimo da viabilidade celular para níveis estatisticamente inferiores ($p < 0,01$) a qualquer dos controlos sendo o valor menor detetado em *S. cerevisiae* cultivadas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ e choque térmico. Estes resultados parecem confirmar o que vem descrito na literatura (315) (316), bem como alguns aspetos especulativos que discutimos na Figura anterior, nomeadamente a perda de viabilidade quando as células são cultivadas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ e/ou choque térmico, resposta que parece estar de acordo com uma modulação negativa do efeito Crabtree.

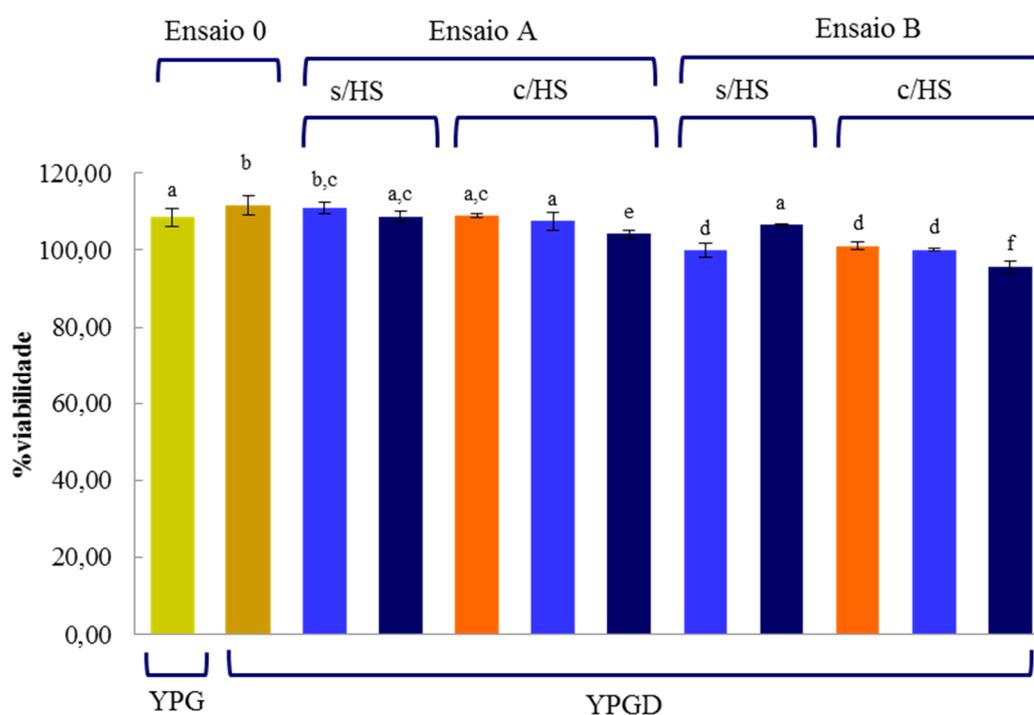


Figura 4.2 Viabilidade celular de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG (■), YPGD (■) na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ (■) e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm (■) e $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm (■), em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A fosfatase alcalina é um enzima que participa na rutura de ligações fosfato com potencial químico elevado e consequente libertação de fosfato inorgânico. O potencial químico disponibilizado poderá então ser utilizado pela célula para assistir ao crescimento, ou nos organismos multicelulares, à diferenciação celular. Neste contexto a Figura 4.3 revela que a transição do meio respirável para o meio respirável-

fermentativo induziu um aumento significativo da atividade enzimática ALP. A referida Figura mostra ainda que células crescidas nos últimos 100 min da cultura na presença de TiO₂-NP (ensaio A) de qualquer dimensão molecular, na ausência de choque térmico, não exerceram efeito com significado estatístico quando comparadas com células crescidas em meio YPGD. Células cultivadas em meio YPGD e expostas nos últimos 100 min a choque térmico na ausência e na presença de TiO₂-NP de qualquer das dimensões moleculares (Figura 4.3) exibiram níveis de atividade ALP significativamente inferiores aos determinados em células respiratório-fermentativas, mas estatisticamente idênticos aos detetados em células respiratórias ($p < 0,01$).

O mesmo perfil de resposta pode ser observado em células do ensaio B, em choque térmico e sem choque térmico quando expostas a TiO₂-NP < 100nm.

Esta alteração na disponibilização do potencial químico, conservado nas ligações fosfato, pode justificar em parte a perda da viabilidade celular referida anteriormente.

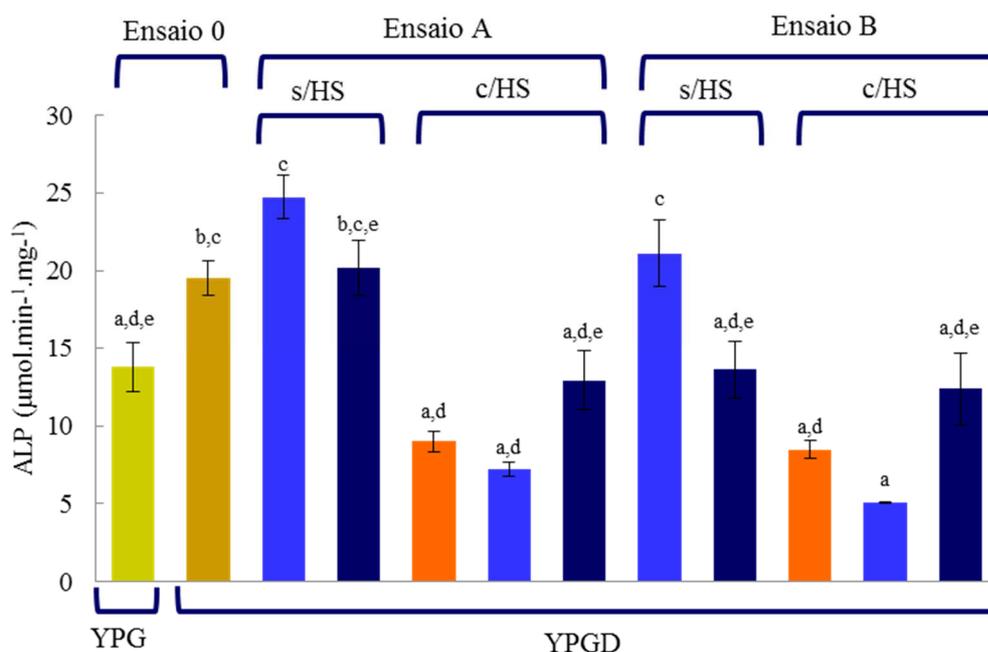


Figura 4.3 Atividade enzimática ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG (■), YPGD (■), YPGD na ausência de TiO₂-NP (■) e na presença de TiO₂-NP <25 nm (■) e TiO₂-NP <100 nm (■), em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

4.2. Influência das condições de cultura no metabolismo energético de *Saccharomyces cerevisiae*

A produção de glicose-6-fosfato, mediada pela hexocinase, faz parte de uma encruzilhada metabólica que envolve duas vias de degradação oxidativa da glicose, a glicólise e a via das pentoses fosfato (PP) (Figura 1.1). A Figura 4.4A mostra que as células crescidas em meio YPGD apresentavam níveis de hexocinase superiores às crescidas em meio YPG ($p < 0,05$). Esta alteração sugere que a adição de glicose provocou um aumento da atividade hexocinase, muito provavelmente para facilitar a produção de ATP pela fermentação aeróbia, bem como pela via PP, através da qual se puderam gerar equivalentes redutores necessários à biossíntese *de novo* de lípidos e para assegurar respostas antioxidantes que garantissem o aumento da viabilidade celular comentado anteriormente (317) (318).

No que diz respeito ao ensaio A, a adição de nanopartículas de qualquer dos tamanhos analisados reforçou o aumento desta atividade catalítica para níveis significativamente superiores aos detetados em células respiratórias. A adição destes agentes de *stress* parece assim ter potenciado a produção de ATP e de equivalentes redutores. No entanto o choque térmico e a exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ com diâmetro molecular <25 ou <100 nm em culturas sujeitas a choque térmico, reverteu os níveis de atividade hexocinase para valores significativamente inferiores aos detetados em células respiratórias e respiratório-fermentativas ($p < 0,01$). Neste caso, o efeito do choque térmico parece ter-se sobreposto ao efeito das nanopartículas, minimizando o fluxo de carbono pelas vias glicolítica e PP.

No ensaio B a exposição a nanopartículas com dimensão <25 nm mantém os níveis de hexocinase estatisticamente idênticos aos das leveduras respiratório-fermentativas. Contudo, células crescidas em meio YPGD e $\text{TiO}_2\text{-NP}$ <100 nm, apresentam níveis de hexocinase idênticos aos de células respiratórias ($p < 0,01$). Um decréscimo ainda mais acentuado desta atividade pode ser observado para células expostas a HS na ausência ou presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ das duas dimensões moleculares estudadas. Neste caso, parece ter ocorrido um efeito sinérgico entre a presença de nanopartículas e o choque térmico, que contribuiu para reverter a atividade hexocinase para níveis inferiores aos determinados em células respiratórias.

O piruvato faz parte de outra encruzilhada metabólica que corresponde à interceção de pelo menos duas vias essenciais à célula: a glicólise e o ciclo do citrato

(Figura 1.1). A sua libertação no citoplasma celular é catalisada por um dos enzimas reguladores da via glicolítica e transportado para a matriz mitocondrial onde após conversão em acetil-CoA é metabolizado pelo ciclo do citrato para gerar equivalentes redutores sob a forma de NADH utilizáveis pela cadeia respiratória. Se o ciclo do citrato for interrompido e a célula permanecer em modo fermentativo, o piruvato permanecerá no citoplasma onde será conseqüentemente reduzido tendo em vista a reoxidação do NADH citoplasmático indispensável à glicólise (5).

A Figura 4.4B mostra que ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$) da atividade piruvato cinase após a adição de glicose ao meio de cultura. Este comportamento poderá ter levado a um eventual aumento dos níveis de estado estacionário de piruvato citoplasmático que poderá ser responsável pela indução de enzimas fermentativos que participam na regulação desta encruzilhada metabólica (144). A referida Figura permite ainda observar que a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ no ensaio A provocou um decréscimo desta atividade catalítica para valores próximos dos encontrados em células respiratórias, com validade estatística para as leveduras expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ ($p < 0,05$) e $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm ($p < 0,01$). A sujeição das leveduras a choque térmico após crescimento durante 100 min em presença de glicose exerceu o mesmo efeito ($p < 0,01$). Todavia, a exposição simultânea a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de qualquer das dimensões analisadas e HS provocou um decréscimo significativo desta atividade catalítica ($p < 0,01$), acentuando a reversão do perfil típico de atividade respiratório-fermentativo pela associação de HS e $\text{TiO}_2\text{-NP}$. No que diz respeito ao ensaio B, a exposição de *S. cerevisiae* a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ sem choque térmico, manteve esta atividade catalítica em níveis próximos de *S. cerevisiae* respiratório-fermentativos, diminuindo a atividade piruvato cinase de células crescidas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm ($p < 0,01$) para níveis próximos dos de células respiratórias. Uma resposta semelhante foi obtida com leveduras submetidas a choque térmico e expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm. Curiosamente, o efeito das nanopartículas com dimensão < 100 e choque térmico foi oposto ao observado com qualquer das nanopartículas analisadas em condições de choque térmico, mantendo níveis próximos dos detetados com leveduras respiratório-fermentativas. Face ao exposto, a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ em choque térmico parece ter revertido o metabolismo respiratório-fermentativo de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao nível dos referidos enzimas reguladores da glicólise. Para além disso a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de maior dimensão em simultâneo com a adição de glicose, bem como a presença de $\text{TiO}_2\text{-$

NP <25 nm e choque térmico parece evitar o estabelecimento do metabolismo respiratório-fermentativo.

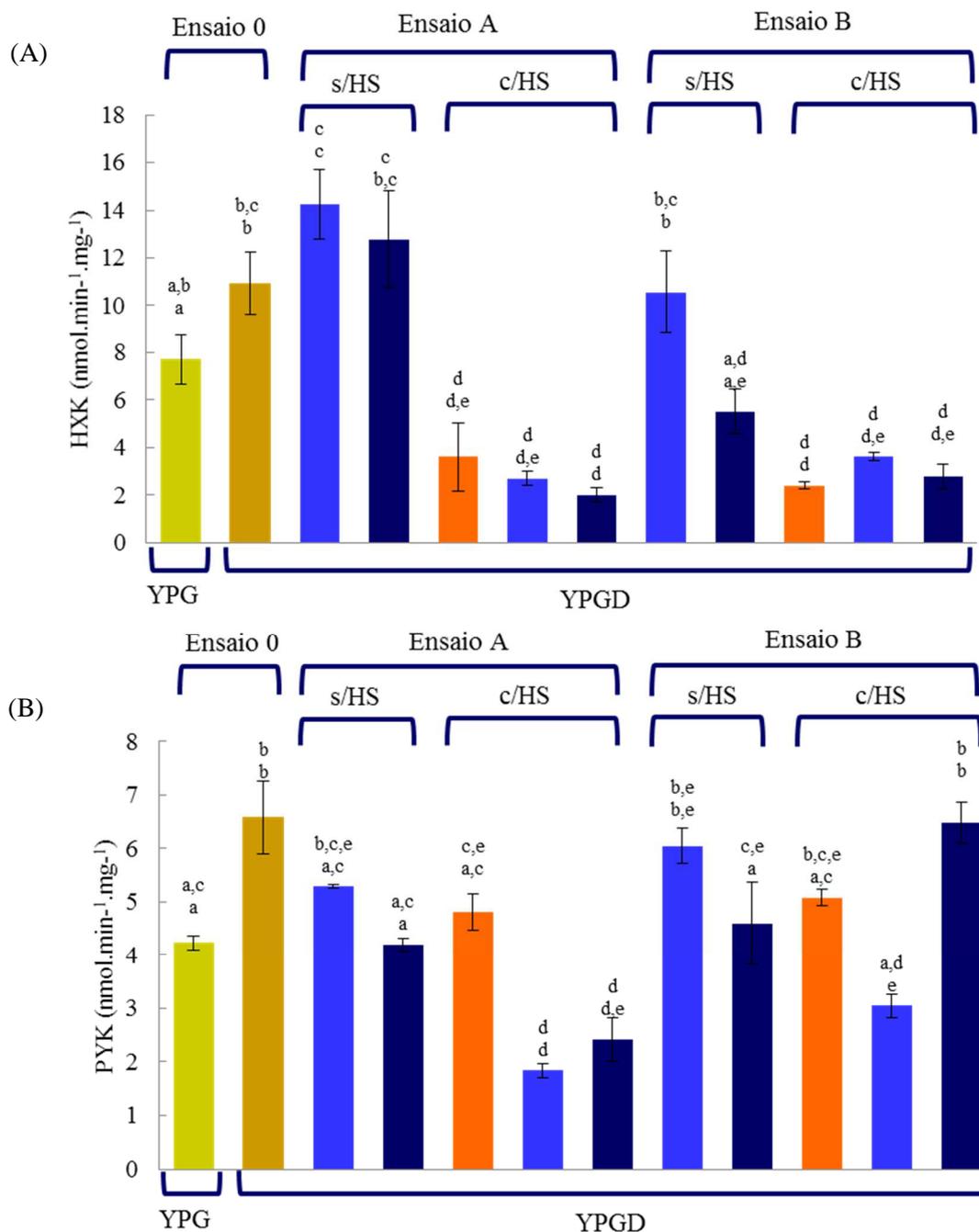


Figura 4.4 Atividades enzimáticas hexocinase (A) e piruvato cinase (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de TiO₂-NP ■ e na presença de TiO₂-NP <25 nm ■ e TiO₂-NP <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p <0,01- linha superior; p <0,05- linha inferior).

A redução do piruvato citoplasmático em *S. cerevisiae* pode ser mediada pelo enzima piruvato descarboxilase ocorrendo a formação de acetaldeído que pode então ser reduzido a etanol pelo enzima álcool desidrogenase que em geral está acoplada à reoxidação do coenzima NADH que assiste à via glicolítica (Figura 1.1). Um aumento desta atividade catalítica é considerado por diversos autores como um bom marcador do efeito de Crabtree (319) (293) (48). Pela Figura 4.5A pode observar-se que a atividade piruvato descarboxilase aumentou significativamente ($p < 0,01$) após a adição de glicose. Como referido anteriormente este efeito poderá estar relacionado com o aumento da atividade piruvato cinase detetada em leveduras respiratório-fermentativas (Figura 4.4). No ensaio A, células crescidas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ exibiam níveis de atividade PDC da mesma ordem de grandeza das detetadas em células respiratório-fermentativas parecendo que nesta situação este tipo de nanopartículas não terá revertido a tendência para as *S. cerevisiae* se manterem fermentativas aeróbias, situação contrária à observada com $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$, cuja atividade PDC diminuiu para níveis idênticos aos de células respiratórias ($p < 0,01$). O choque térmico e nanopartículas de qualquer das dimensões estudadas exerceram efeito estatisticamente idêntico ao das $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ sem choque térmico, revertendo o metabolismo respiratório-fermentativo para respiratório.

Relativamente ao ensaio B, a presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de menor dimensão evitou a transição do metabolismo respiratório para respiratório-fermentativo, no entanto as células expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de maior dimensão apresentavam valores de PDC intermédios entre os obtidos com células respiratórias e respiratório-fermentativos, não diferindo estatisticamente de qualquer dos tratamentos. No que diz respeito ao estímulo pelo choque térmico apenas as $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de menor dimensão exerceram um efeito estimulante sobre a atividade PDC com significado estatístico ($p < 0,01$). Pode assim inferir-se que a presença de nanopartículas de dióxido de titânio < 25 nm, *per si*, parecem ter a capacidade de evitar a transição do metabolismo respiratório para respiratório-fermentativo.

No seguimento da via que pode conduzir à fermentação alcoólica (Figura 1.1), a Figura 4.5B revela que a adição de glicose ao meio de cultura induziu, tal como descrito na literatura, um acréscimo significativo ($p < 0,01$) da atividade álcool desidrogenase (297) (293). Pela mesma Figura, pode observar-se que *S. cerevisiae* crescidas na presença de nanopartículas de qualquer das dimensões analisadas, não induziu

alterações com significado estatístico da atividade ADH comparativamente com leveduras em modo respiratório-fermentativo.

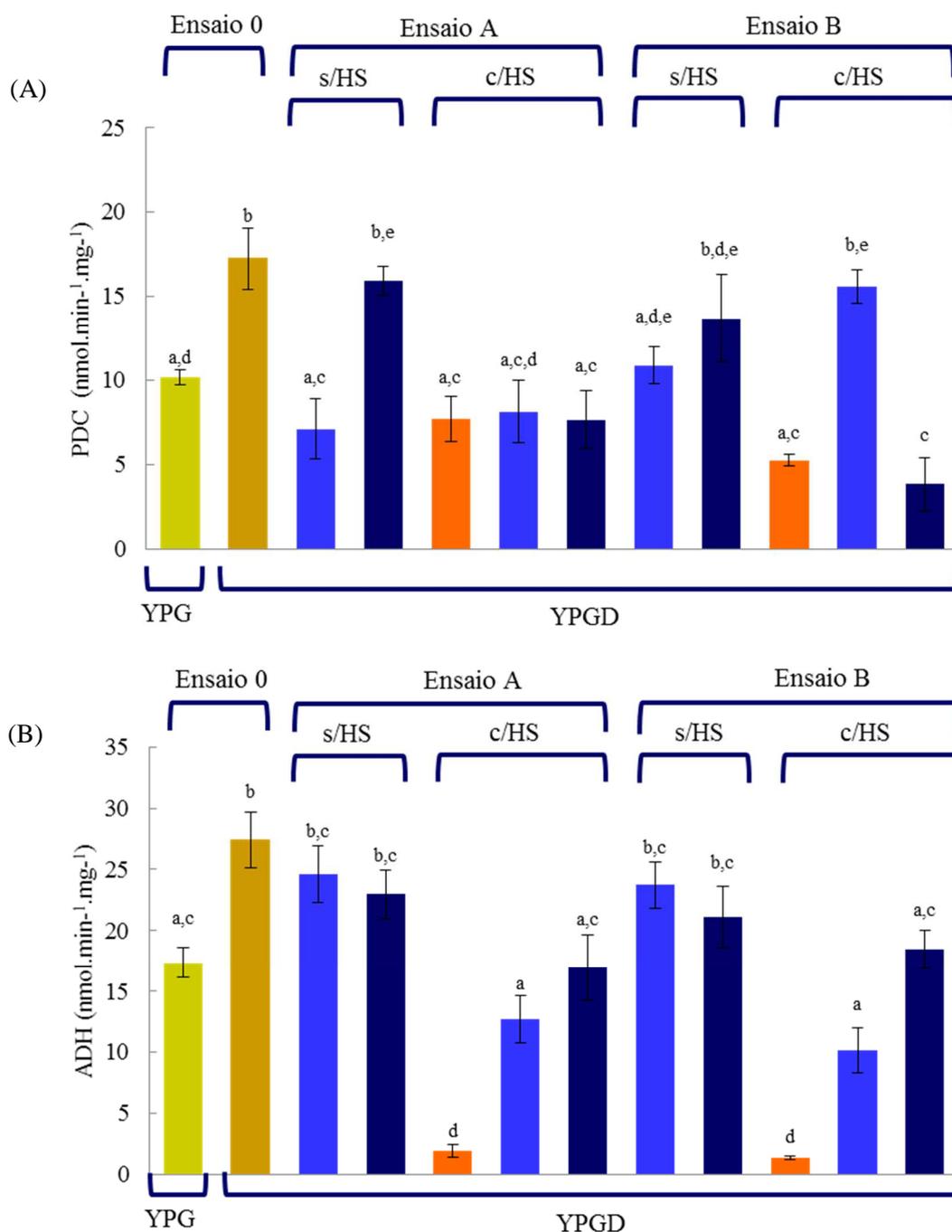


Figura 4.5 Atividades enzimáticas piruvato descarboxilase (A) e álcool desidrogenase (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de TiO₂.NP ■ e na presença de TiO₂.NP <25 nm ■ e TiO₂.NP <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

No entanto observa-se uma linha de tendência de decréscimo uma vez que os valores obtidos na presença de nanopartículas também não diferem do determinado em leveduras em modo respiratório. O choque térmico afetou significativamente esta atividade catalítica, incluindo quando nanopartículas de qualquer das dimensões estudadas estavam presentes no meio de cultura. Neste segundo caso, os valores da ADH obtidos ficaram estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos determinados em leveduras em modo respiratório, permitindo inferir que o efeito combinado de nanopartículas com choque térmico poderá ter causado uma reversão do metabolismo fermentativo aeróbio para respiratório. Os resultados obtidos no ensaio B exibem um perfil de resposta estatisticamente idêntico aos observados no ensaio A, pelo que se pode inferir um bloqueio da progressão do metabolismo energético de *S. cerevisiae* UE-ME₃, para o modo respiratório-fermentativo se a exposição ao choque térmico e às TiO₂-NP de qualquer dimensão ocorrer com a adição de glicose.

Embora *S. cerevisiae* possua lactato desidrogenases endógenos, duas mitocondriais DLD1 e DLD2 que reconhecem exclusivamente o lactato como substrato, e uma citoplasmática DLD3 cujo papel biológico se desconhece, a literatura refere que a expressão da DLD3 (95) é reprimida pela presença de glicose no meio de cultura, e que a produção de lactato nessas condições experimentais é muito baixa. Por esse motivo a competição entre o metabolismo respiratório e fermentativo dá-se pelo aumento da expressão funcional dos enzimas reguladores envolvidos na fermentação alcoólica. Apesar disso, procurou-se avaliar de que forma esta atividade catalítica em *S. cerevisiae* expostas a glicose, responde às condições experimentais delineadas para este estudo (157) (5) (158).

A representação gráfica da Figura 4.6 mostra-nos que a atividade citoplasmática DLD de células respiratórias é significativamente superior ($p < 0,01$) à determinada em células fermentativo-respiratórias, ocorrendo uma quebra de aproximadamente 40 pontos percentuais, efeito que confirma a repressão desta atividade catalítica pela glicose descrita na literatura (37).

No ensaio A, a adição de nanopartículas de qualquer das dimensões estudadas não afetou significativamente esta atividade enzimática comparativamente com células respiratório-fermentativas. O choque térmico e a exposição a TiO₂-NP <100 nm em choque térmico também manteve os níveis desta atividade catalítica estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos detetados em *S. cerevisiae* respiratório-fermentativas. Porém, o

efeito combinado da exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25 \text{ nm}$ em HS provocou um aumento da DLD para níveis estatisticamente semelhantes ($p < 0,01$) aos de células respiratórias, parecendo neste caso particular ocorrer uma reversão do efeito inibitório induzido pela glicose em células respiratório-fermentativas.

O perfil de resposta às nanopartículas, no ensaio B, foi estatisticamente semelhante ($p < 0,01$) ao observado em células respiratório-fermentativas. Contudo a exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100 \text{ nm}$ e choque térmico em simultâneo com a adição de glicose, parece potenciar o efeito inibitório pela glicose sobre este enzima, enquanto que a exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25 \text{ nm}$ e HS anula o efeito inibitório da presença de glicose, mostrando um valor idêntico ($p < 0,01$) ao observado em células respiratórias.

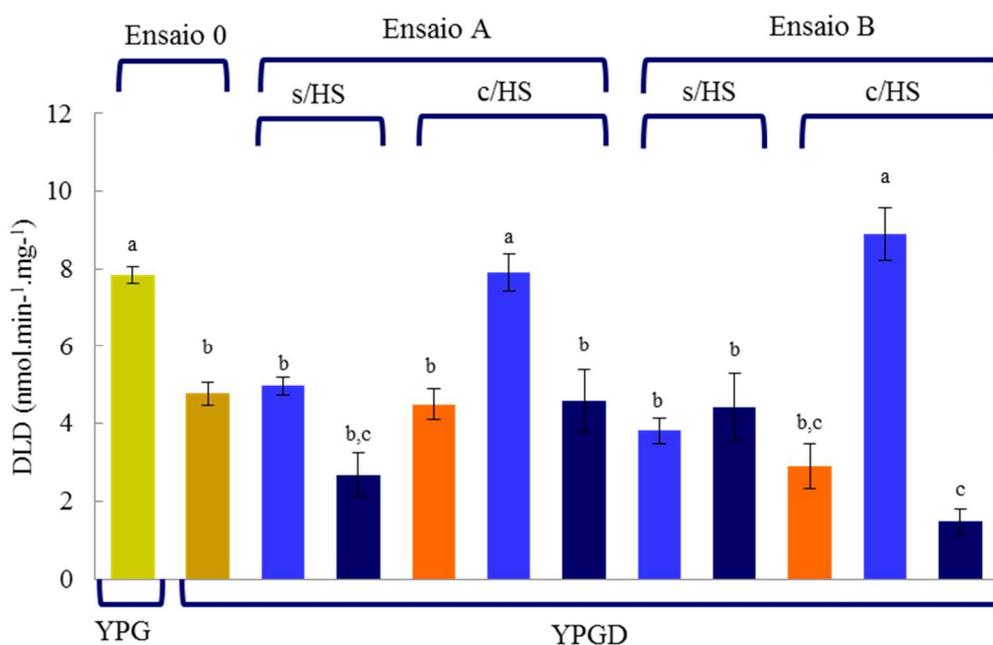


Figura 4.6 Atividade enzimática lactato desidrogenase de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG , YPGD , YPGD na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP}$  e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25 \text{ nm}$  e $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100 \text{ nm}$ , em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Paralelamente com o aumento da atividade glicolítica e fermentação alcoólica observada na glicólise em aerobiose, ocorre um bloqueio da atividade respiratória ao nível do ciclo do citrato na matriz mitocondrial e cadeia de transporte de eletrões da membrana interna mitocondrial (37) (38).

O enzima succinato desidrogenase (SDH ou complexo II) é responsável pela transferência de elétrões desde o succinato, gerado no ciclo do citrato, via FADH₂ até à ubiquinona ou coenzima Q da cadeia respiratória (Figura 1.1) (322).

Pela Figura 4.7 pode observar-se um decréscimo significativo ($p < 0,01$) das atividades citrato sintase, um dos enzimas reguladores do ciclo do citrato que participa na condensação do oxaloacetato com o acetil-CoA proveniente da descarboxilação oxidativa do piruvato mediada pela piruvato desidrogenase e da succinato desidrogenase em leveduras crescidas após a adição de glicose (37) (320) (Figura 4.7A e B). Estes resultados permitem inferir o bloqueio do metabolismo respiratório induzido pela glicólise em condições aeróbias. Para além disso, a inibição da atividade succinato desidrogenase indicia um bloqueio na transferência de equivalentes redutores sob a forma de FADH₂ para a cadeia respiratória (38) (37) (321).

Os resultados obtidos no ensaio A para ambos os enzimas revelam que a exposição de leveduras respiratório-fermentativas a TiO₂-NP <25 nm reverteu parcialmente a inibição induzida pela presença de glicose em concentração elevada no meio de cultura. Contudo, para nanopartículas com maior dimensão molecular observou-se um efeito inverso, ocorrendo um decréscimo significativo ($p < 0,01$) das atividades citrato sintase e succinato desidrogenase, acentuando o bloqueio respiratório induzido pela glicose.

O choque térmico diminuiu estas duas atividades catalíticas para níveis vestigiais ($p < 0,01$). No entanto, a exposição a nanopartículas em choque térmico parece ter evitado o efeito do choque térmico mantendo os níveis de citrato sintase e succinato desidrogenase mais próximos dos determinados em células respiratório-fermentativas ainda que estatisticamente inferiores ($p < 0,01$), no caso da exposição a TiO₂-NP <25 nm, e estatisticamente superiores ($p < 0,01$) no caso de TiO₂-NP <100 nm (Figura 4.7 A e B).

Curiosamente, no ensaio B, a exposição a nanopartículas de qualquer dimensão não alterou estatisticamente a atividade citrato sintase (Figura 4.7A) que permaneceu idêntica à detetada em *S. cerevisiae* respiratório-fermentativa. Relativamente à atividade succinato desidrogenase (Figura 4.7B), a exposição a TiO₂-NP <100 nm induziu um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da atividade SDH comparativamente com células respiratório-fermentativas, uma resposta semelhante à registada no ensaio A para as mesmas condições experimentais.

O choque térmico no ensaio B exerceu um efeito semelhante ao determinado no ensaio A, com decréscimo das atividades CS e SDH para níveis vestigiais.

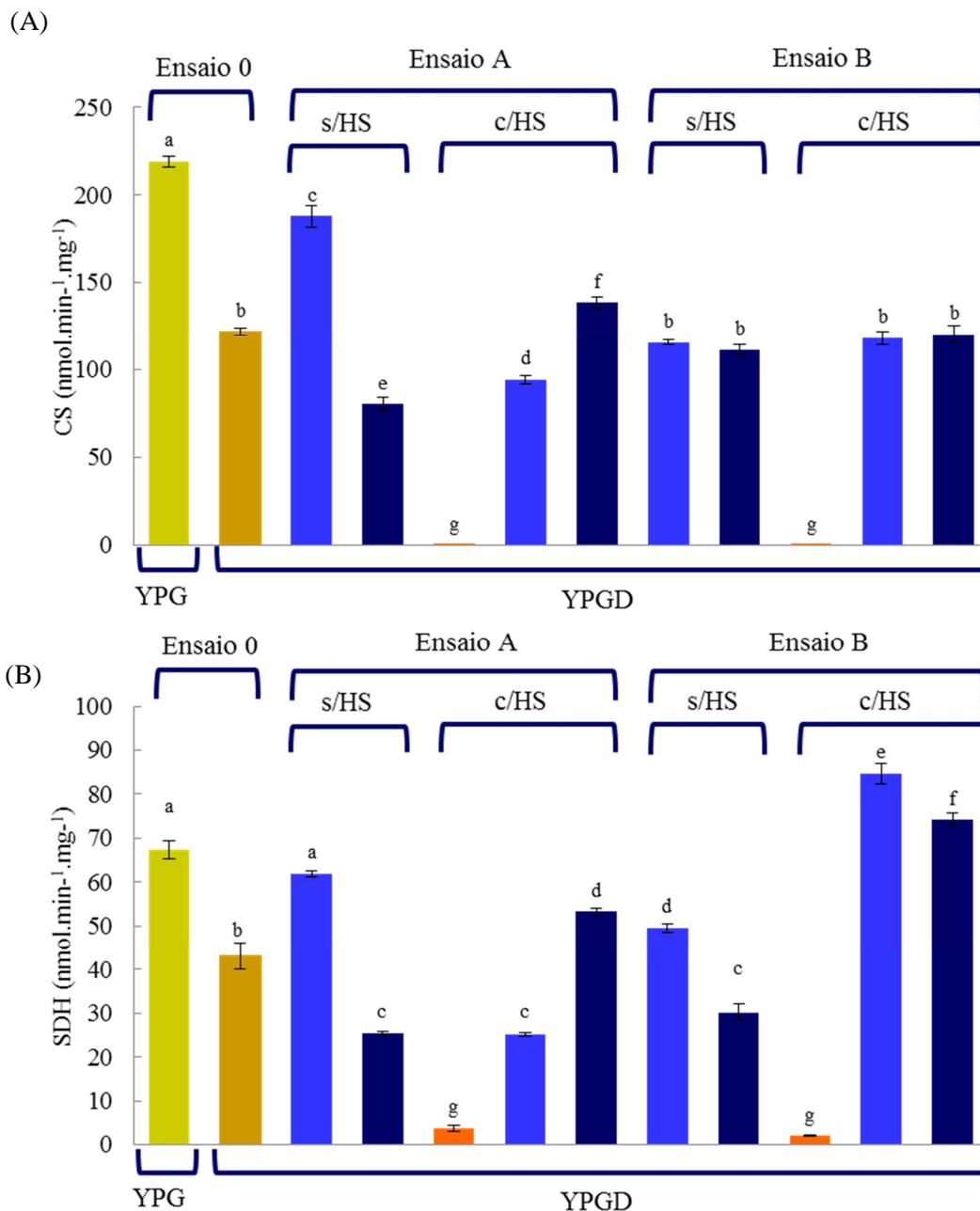


Figura 4.7 Atividades enzimáticas citrato sintase (A) e succinato desidrogenase (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de TiO₂-NP ■ e na presença de TiO₂-NP <25 nm ■ e TiO₂-NP <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Todavia, no ensaio B a adição de TiO₂-NP de qualquer dimensão estudada neste trabalho, não perturbou significativamente os níveis de atividade enzimática CS, mantendo-os idênticos aos determinados em *S. cerevisiae* respiratório-fermentativos. Surpreendentemente, em leveduras expostas a TiO₂-NP <25 e <100 nm e choque térmico os níveis da atividade SDH são significativamente superiores (p <0,01) aos determinados em células respiratórias, impedindo a evolução desta actividade catalítica para níveis próximos dos determinados em células respiratório-fermentativas.

Deste modo, pode inferir-se que a exposição a nanopartículas e choque térmico em simultâneo com a adição de glicose ao meio de cultura, contribuiu para evitar o bloqueio respiratório induzido pela glicólise ao nível da succinato desidrogenase, facilitando o fluxo de eletrões para a cadeia respiratória.

A levedura *S. cerevisiae* ao contrário das células animais não apresenta o complexo I, mas dispõe de 3 NADH desidrogenases insensíveis à rotenona e localizadas na membrana interna mitocondrial. Os equivalentes redutores sob a forma de NADH gerados na matriz mitocondrial são oxidados pela NADH ubiquinona oxirredutase também denominada NADH desidrogenase interna (NDI1) (Figura 1.1).

Alguns autores sugerem que este enzima desempenha um papel relevante na regulação do equilíbrio redox, ao nível do NADH mitocondrial produzido pelo ciclo do citrato, sendo também capaz de oxidar o NADH produzido pela oxidação do etanol via transportador acetaldeído/etanol. Tal como os mitocondrios das plantas, os mitocondrios da levedura são capazes de oxidar diretamente o NADH citosólico.

Dois enzimas NADH desidrogenases externos (NDE1 e NDE2) estão localizados na membrana interna mitocondrial com os seus centros ativos expostos ao espaço intermembranar. Devido à membrana interna mitocondrial ser impermeável ao NADH, a literatura admite que estas enzimas são capazes de oxidar NADH produzido pela glicólise, embora apenas alguns autores sugiram que também estão primariamente envolvidos na respiração durante o crescimento em álcoois como o etanol ou o glicerol. O NDE1p e NDE2p assim como a NADH desidrogenase interna são insensíveis à rotenona e não participam no bombeamento de protões (164) (165) (168).

Alternativamente o NADH gerado no citosol durante a glicólise pode ser oxidado pela cadeia respiratória utilizando o transportador glicerol-3-fosfato desidrogenase, uma glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada ao NADH citoplasmático e uma glicerol-3-fosfato: ubiquinona oxidoreductase ligada à membrana (164) (165).

Todas as vias de oxidação respiratória dos coenzimas NADH ou FADH₂ de *S. cerevisiae* convergem para o *pool* de ubiquinona. A cadeia de transporte de elétrons prossegue, após transferência dos elétrons da ubiquinona para o citocromo c, via complexo citocromo bc1 ou complexo III. A oxidação no citocromo c pelo dioxigénio é então catalisada pelo citocromo c oxidase (COX ou complexo IV) (167).

Neste estudo, optou-se por avaliar como as diferentes condições de ensaio influenciavam as NADH desidrogenases externas, a Figura 4.8 mostra-nos que a adição de glicose ao meio de cultura provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da atividade NADH ubiquinona desidrogenase para valores de aproximadamente 1/3 da que foi determinada em células crescendo apenas utilizando glicerol como fonte de carbono.

Este resultado está de acordo com o que foi observado na Figura 4.7 compatível com uma repressão do metabolismo respiratório-oxidativo pela glicose (320) (37) (293). A Figura 4.8 revela ainda que no ensaio A, o choque térmico e a exposição de *S. cerevisiae* a nanopartículas com diâmetro < 25 nm e < 100 nm com e sem HS mantiveram os níveis de atividade NADH desidrogenase idênticos aos determinados em *S. cerevisiae* respiratório-fermentativas.

No ensaio B pode observar-se pela Figura 4.8 que a exposição a nanopartículas de qualquer das dimensões moleculares estudadas, sem choque térmico, manteve os níveis de atividade NADH desidrogenase estatisticamente próximos dos valores determinados em células respiratório-fermentativas.

Embora o choque térmico tenha inibido acentuadamente esta atividade catalítica, quando aplicado no instante em que foi adicionada a glicose, o efeito conjunto da exposição a TiO₂-NP < 100 nm com HS manteve os níveis de atividade NADH desidrogenase idênticos ($p < 0,01$) aos detetados em células respiratórias. A manutenção desta atividade enzimática parece estar ao serviço da oxidação do NADH citoplasmático formado pela via glicolítica.

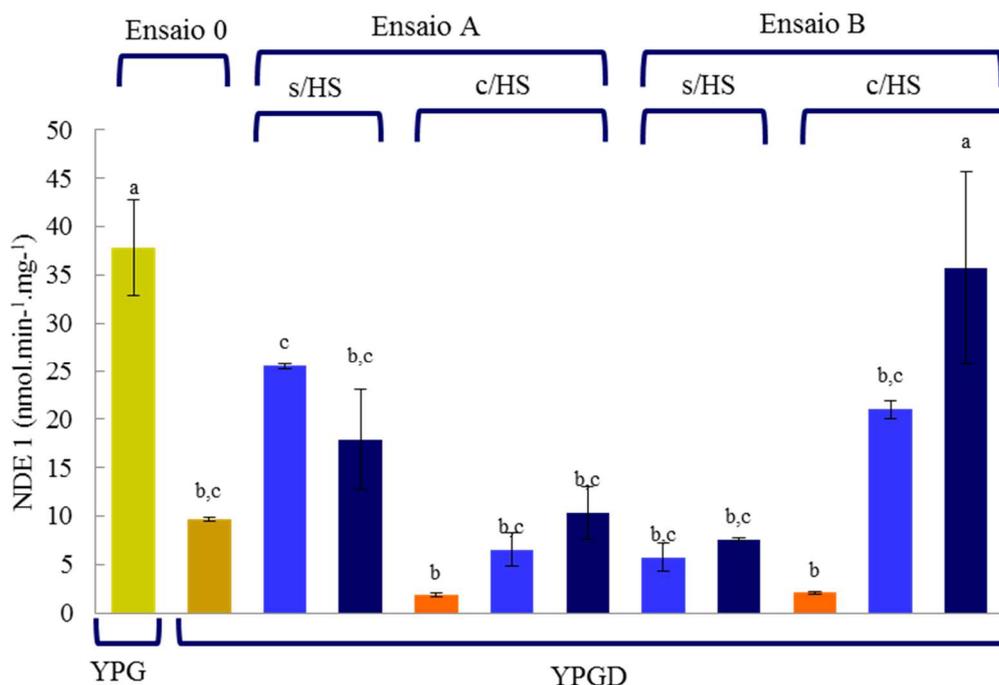


Figura 4.8 Atividade enzimática NADH desidrogenase externa 1 de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG (■) YPGD (■), YPGD na ausência de TiO₂-NP (■) e na presença de TiO₂-NP <25 nm (■) e TiO₂-NP <100 nm (■) em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

O enzima malato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do L-malato em piruvato e CO₂, acoplada à redução dos nucleótidos piridínicos NAD⁺ ou NADP⁺. No metabolismo glucídico fermentativo de leveduras, o piruvato, um importante substrato que participa em encruzilhadas metabólicas que envolvem a metabolização de glúcidos é posteriormente descarboxilado a acetaldeído pela PDC e subsequentemente reduzido pela ADH. Os enzimas malato desidrogenase (EC 1.1.1.37/38) exibem em geral um elevado grau de homologia, mas a sua localização intracelular é diferente, podendo expressar-se ao nível do citoplasma e do mitocondrio. Diferem ainda no que diz respeito à afinidade e especificidade para o substrato (L-malato e/ou oxaloacetato), na especificidade para o cofator e no grau de reversibilidade da reação de descarboxilação. Os produtos finais das reações do enzima malato desidrogenase, isto é, o piruvato, CO₂ e NAD(P)H, são utilizados por diversas vias metabólicas que podem ser grosseiramente agrupadas como: *i*) vias onde enzimas malato desidrogenase NAD⁺ dependentes estão envolvidos em processos metabólicos, ou *ii*) vias onde os enzimas NADP⁺ dependentes desempenham um papel nos processos biossintéticos redutores. De acordo com este ponto de vista, os isoenzimas malato

desidrogenase dependentes de NAD^+ desempenham um papel importante na geração de ATP através da produção de NADH e piruvato. Contrastando com o que foi exposto, a reação reversa que envolve enzimas malato desidrogenase dependentes do NADP^+ onde ocorre a carboxilação do piruvato em malato, desempenham um papel importante constitutivo nas reações anapleróticas no ciclo do citrato, em procariontes e eucariontes (171) (322) (174).

As isoformas NADP^+ dependentes do enzima malato desidrogenase de leveduras assistem maioritariamente a reações biossintéticas, em particular as que envolvem a biossíntese e insaturação de lípidos. Quando a disponibilidade de ATP é elevada, o acetil-CoA pode ser deslocado para a síntese de lípidos, contribuindo para aumentar as reservas energéticas. No entanto, o acetil-CoA mitocondrial, deve ser convertido em citrato através do sistema de transporte de tricarboxilatos para participar na síntese de resíduos acilo no citoplasma. O enzima citrato sintase anteriormente descrito, condensa o acetil-CoA com o oxaloacetato para produzir citrato, sendo este transportado do mitocondrio para o citoplasma. No citoplasma, o citrato é reconvertido em oxaloacetato pelo enzima citrato liase e posteriormente reduzido a malato pela malato desidrogenase, sendo o malato oxidado a piruvato pelo enzima malato desidrogenase com geração acoplada de NADPH utilizável na biossíntese de lípidos (Figura 1.1). O piruvato pode também ser reimportado pelo mitocondrio, assim como o malato, se houver necessidade de gerar NADH, via malato desidrogenase mitocondrial (179).

A literatura descreve que a *S. cerevisiae* apenas utiliza o L-malato na presença de uma ou mais fontes de carbono fermentáveis. No entanto a utilização de L-malato por *S. cerevisiae* é mais fraca do que a manifestada por outras leveduras como a *S. pombe* que parece ter otimizado evolutivamente a degradação do L-malato (174). O enzima malato desidrogenase citoplasmático (MDH2) parece não ser essencial para sobrevivência de *S. cerevisiae*, uma vez que deleções no gene codificante não influenciam a sua viabilidade. Contudo alguns autores atribuem ao enzima malato desidrogenase mitocondrial (MAE1, MDH1, MDH3) um papel relevante no metabolismo de *S. cerevisiae*. A localização mitocondrial do enzima (MAE1, MDH1, MDH3) de *S. cerevisiae* pode determinar a fraca degradação do malato por estirpes de *S. cerevisiae* cultivadas em condições fermentativas. A expressão do gene *mae1* é, em geral baixa, mas constitutiva em leveduras cultivadas com diferentes fontes de carbono, como por exemplo glicose, etanol e acetato. Outros investigadores sugerem um papel

fisiológico complementar ao descrito aqui para o enzima malato desidrogenase mitocondrial (MAE1) de *S. cerevisiae*, admitindo a sua participação em vias metabólicas auxiliares que regenerem o principal cofator biossintético NADPH (322). Em condições respiratório-fermentativas, o fluxo de carbono de *S. cerevisiae* é deslocado da biossíntese para a produção de etanol quer em condições anaeróbias, quer aeróbias. Todavia, em condições fermentativas torna-se essencial alguma atividade biossintética que garanta a sobrevivência celular. Essa atividade leva ao consumo líquido de NADPH e à produção líquida de NADH (5).

Como a fermentação alcoólica é um processo redox-neutro, a formação de etanol não contribui para a reoxidação do NADH assimilatório. A *S. cerevisiae* e outras leveduras resolveram este dilema redox, reduzindo a glicose a glicerol, acoplada a reoxidação de NADH. De acordo com este modelo, o enzima malato desidrogenase, o piruvato carboxilase, o enzima malato desidrogenase (MDH2 dependente de NADP⁺) atuam como transportadores transhidrogenase-cíclicos, que convertem o NADH gerado no metabolismo biossintético em NADPH e assim sustentam as necessidades biossintéticas das células de levedura. A localização mitocondrial do enzima malato desidrogenase de *S. cerevisiae*, sugere que este enzima se encontra submetido ao efeito regulador do metabolismo fermentativo da glicose, assim como à deterioração mitocondrial, um fenómeno bem documentado em leveduras Crabtree positivas, as quais acentuam a fraca metabolização do malato por *S. cerevisiae*.

O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, um percurso metabólico para a degradação da glicose que para além de gerar ATP tem como principal missão biológica produzir equivalentes redutores sob a forma de NADPH e precursores da biossíntese de nucleótidos sob a forma de ribose-5-fosfato. Embora o balanço energético em termos de geração de ATP seja elevado, a célula só a utiliza com essa função desde que tenha necessidade de gerar NADPH e/ou ribose-5-fosfato que assistem atividades anabólicas como a biossíntese de novo de resíduos acilo e de DNA. Um papel complementar desta via é participar na capacidade de resposta antioxidativa da célula, uma vez que os equivalentes redutores sob a forma de NADPH podem ainda ser utilizados pelo ciclo de oxi-redução do glutatióno envolvido na estabilização do saudável ambiente redutor da célula. Assim, à semelhança do enzima MDH2 esta via metabólica é particularmente importante na estabilização do ambiente redutor mediado pelos coenzimas flavínicos e pelo tripéptido glutatióno (197)

(198). As Figuras 4.9 e 4.10 representam os valores da atividade do enzima malato desidrogenase mitocondrial (MAE1, MDH1, MDH3) e citoplasmático (MDH2) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) o enzima chave da via das pentoses fosfato.

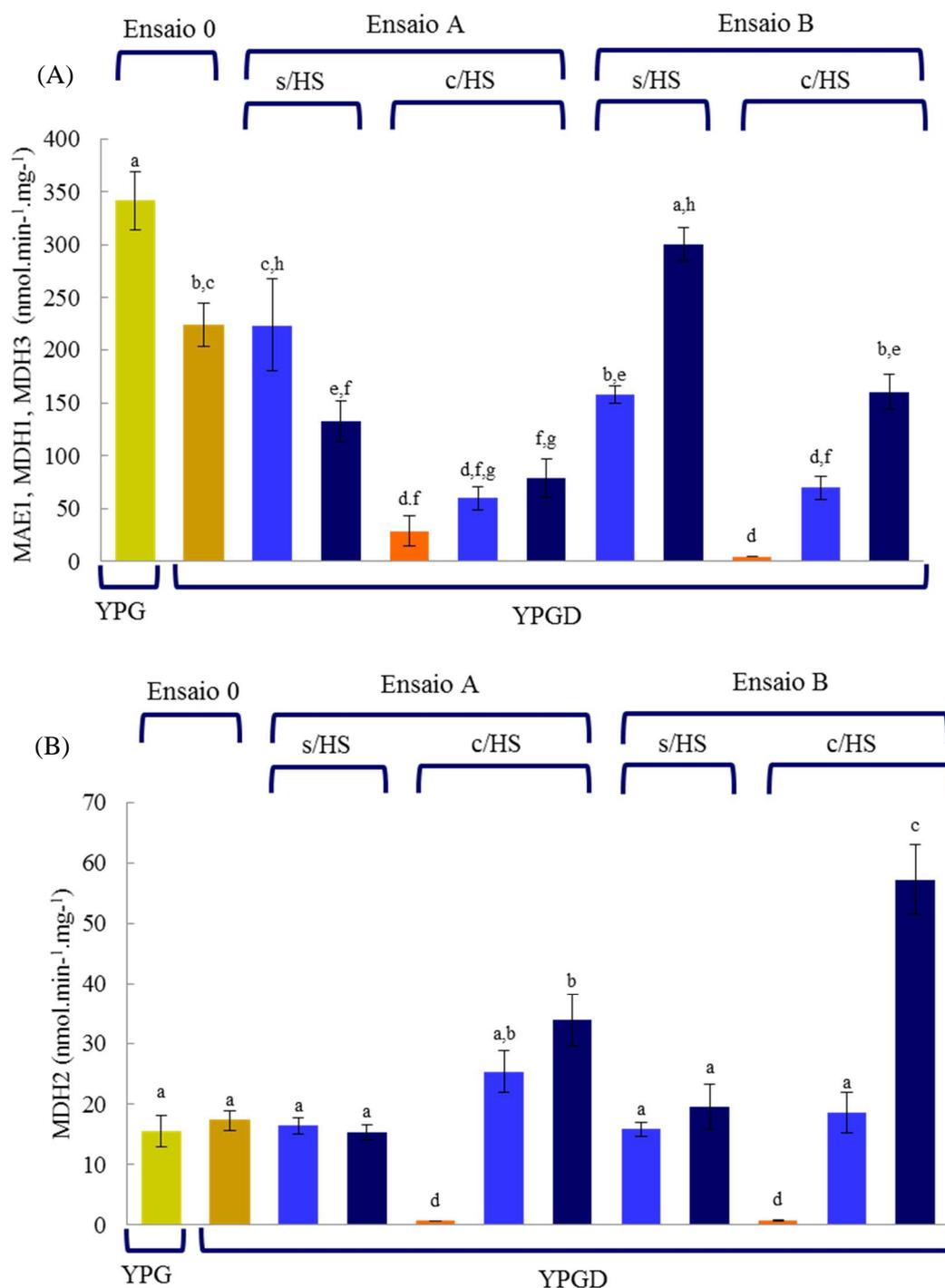


Figura 4.9 Actividade enzimática enzima malato desidrogenase mitocondrial (A) e enzima malato desidrogenase citoplasmático (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de TiO₂-NP ■ e na presença de TiO₂-NP <25 nm ■ e TiO₂-NP <100 nm ■ em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

A partir da Figura 4.9A pode observar-se que a adição de glicose ao meio de cultura provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da atividade enzimática malato desidrogenase mitocondrial. Resposta compatível com a indução da fermentação aeróbia, cuja ocorrência é justificada na literatura pelo decréscimo da atividade respiratória mitocondrial na qual se inclui este enzima (5) (116). O papel do malato desidrogenase mitocondrial nestas condições mostra-se diminuído provavelmente porque as necessidades em coenzima NADH oxidáveis pela cadeia respiratória, para produção de ATP, encontram-se diminuídos, devido ao bloqueio do ciclo do citrato e da cadeia respiratória (Figura 1.1), como descrito na literatura (157) (5) (320).

No que diz respeito ao ensaio A, a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm sem choque térmico, não reverteu os níveis desta atividade para valores próximos dos registados em células respiratórias, tendo-se observado semelhanças estatísticas ($p < 0,01$) com os níveis de atividade de células respiratório-fermentativas (Figura 4.9A). Por outro lado a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm sem HS e células expostas a choque térmico, na presença ou na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ ou < 100 nm, exibiam um decréscimo significativo desta atividade catalítica mitocondrial para níveis inferiores aos detetados em células respiratório-fermentativas (Figura 4.9A).

Relativamente ao ensaio B, apenas a adição de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm, sem choque térmico manteve a atividade malato desidrogenase mitocondrial em níveis semelhantes ($p < 0,01$) aos de células respiratórias, enquanto que células expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm permaneceram com níveis de atividade estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos de células respiratório-fermentativas (Figura 4.9A). Células expostas a choque térmico sem ou com exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ mantiveram os níveis desta atividade enzimática idênticos aos observados no ensaio A para as mesmas condições experimentais. Nos casos em que o decréscimo desta atividade catalítica foi acentuado pelos tratamentos, pode inferir-se que a disponibilidade de acetil-CoA citoplasmático, resultante da rutura do citrato, transferido do mitocondrio para o citoplasma foi seriamente diminuída.

No que diz respeito a atividade do enzima malato desidrogenase citoplasmático (MDH2) a Figura 4.9B mostra que não existiam diferenças significativas desta atividade entre células respiratórias e respiratório-fermentativas. Relativamente ao ensaio A a adição de nanopartículas sem choque térmico, não induziu alterações significativas. Contudo, a exposição ao HS induziu um decréscimo significativo ($p < 0,01$) desta atividade catalítica para níveis vestigiais, apesar de surpreendentemente, o efeito

conjunto da adição de nanopartículas de qualquer das dimensões estudadas e choque térmico, ter induzido um aumento da atividade do enzima MDH2 para níveis superiores aos detetados em qualquer dos controlos, embora com significado estatístico apenas para $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ com HS ($p < 0,01$).

O ensaio B mostrou uma resposta ao contacto com $\text{TiO}_2\text{-NP}$, sem choque térmico, idêntica à observada no ensaio A (Figura 4.9A). Neste ensaio o perfil de resposta ao choque térmico na ausência e na presença de nanopartículas, foi também idêntico ao detetado no ensaio A.

De acordo com os comentários descritos anteriormente, a exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ e choque térmico, especialmente no ensaio B, contribuiu para aumentar a disponibilidade de nucleótidos flavínicos fosforilados no citoplasma, provavelmente para suportar a resposta antioxidante mediada pelo enzima glutatióno redutase do ciclo de oxi-redução do glutatióno comentado na Figura 4.11A (ponto 4.3).

A Figura 4.10 representa os níveis de atividade G6PD para cada situação experimental abordada neste estudo. A referida Figura permite observar que as células respiratório-fermentativas exibiam valores desta atividade catalítica superiores aos determinados em células respiratórias, com significado estatístico para 95%. Células do ensaio A, expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm, sem choque térmico, mostram um decréscimo desta atividade catalítica para níveis semelhantes ($p < 0,01$) aos observados em células respiratórias e diferenciados dos observados nas respiratório-fermentativas. Por outro lado, leveduras expostas a choque térmico na ausência e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ com dimensão < 25 ou < 100 nm apresentavam níveis de atividade G6PD significativamente inferiores ($p < 0,01$) aos detetados quer em células respiratórias, quer em células respiratório-fermentativas (Figura 4.10). Esta diminuição da atividade catalítica poderá ter fragilizado as defesas antioxidantes da célula, em particular a capacidade de regenerar glutatióno via glutatióno redutase (323) (Figura 4.11A), bem como fragilizado a capacidade anabólica de biossíntese de novo de resíduos acilo necessários à construção de membranas que assiste à proliferação celular e justificar parcialmente a perda de viabilidade celular descrita para leveduras expostas $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ e choque térmico (Figura 4.2A).

No que diz respeito ao ensaio B observa-se que a exposição a nanopartículas de qualquer das dimensões estudadas neste trabalho mantiveram os níveis de atividade G6PD idênticos aos de células respiratórias e respiratório-fermentativas (Figura 4.10).

Neste ensaio, leveduras submetidas a choque térmico e choque térmico e $\text{TiO}_2\text{-NP} <25$ nm apresentavam níveis de atividade G6PD idênticos ($p < 0,01$) aos apresentados para os mesmos tratamentos no ensaio A. Todavia, a exposição de células respiratório-fermentativas a $\text{TiO}_2\text{-NP} <100$ nm e HS estabilizou a atividade G6PD em níveis semelhantes ($p < 0,01$) ao de células respiratórias, impedindo a evolução do metabolismo energético para respiratório-fermentativo.

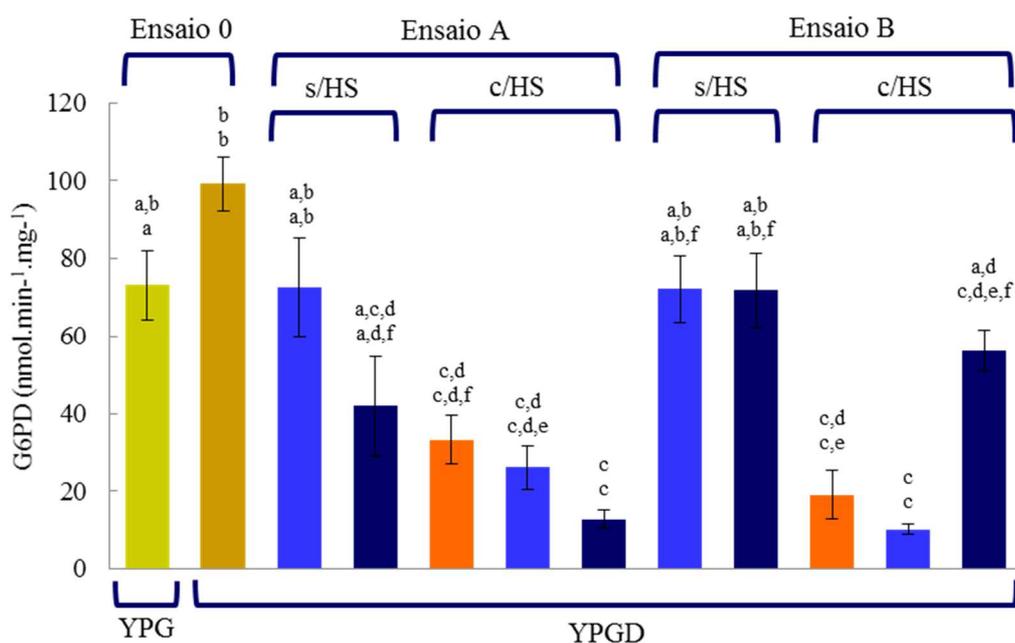


Figura 4.10 Actividade enzimática glicose-6-fosfato desidrogenase de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG (■), YPGD (■), YPGD na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ (■) e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} <25$ nm (■) e $\text{TiO}_2\text{-NP} <100$ nm (■), em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$ - linha superior; $p < 0,05$ - linha inferior).

4.3. Influência das condições de cultura na capacidade antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* responde ao *stress* oxidativo utilizando diversos mecanismos que asseguram a sua sobrevivência após exposição a agentes oxidantes. Estas respostas incluem sistemas que capturam espécies reativas de oxigénio, reduzem a sua taxa de produção e reparação de danos por elas infligidos. A maior parte dessas respostas são específicas para espécies reativas de oxigénio, mas constituem respostas genéricas ao *stress* que são despoletadas em diversas condições. As defesas antioxidantes incluem enzimas protetores localizados em diferentes compartimentos celulares e que podem ver alterada a sua expressão como resposta às ROS (324) (211).

Os mecanismos de defesa não enzimáticos consistem em moléculas de pequena dimensão com capacidade para capturar espécies reativas como o tripéptido γ - glutamyl-cisteinyl-glicina, vulgarmente designado por glutathione. Assim, a oxidação de grupos sulfidrílo é um dos primeiros eventos observáveis em processos mediados por ROS que causam danos celulares. Este facto realça a importância do glutathione, a mais abundante fonte de tióis não proteicos na maior parte dos organismos. A literatura propõe para o GSH uma enorme variedade de processos celulares que inclui transporte de aminoácidos, síntese de ácidos nucleicos e proteínas, modulação de atividades enzimáticas e metabolização de xenobióticos e ROS (217) (218).

O glutathione é um metabolito essencial em leveduras, sendo utilizado como agente redutor nas condições de crescimento normais. Os agentes indutores de *stress* oxidativo convertem o glutathione em dissulfureto de glutathione. Todavia, o glutathione encontra-se maioritariamente na forma de GSH em leveduras e outros eucariontes devido ao papel do enzima de expressão constitutiva glutathione reductase, uma oxidoreductase dependente de NADPH que converte o GSSG em GSH utilizando os equivalentes redutores gerados pela via das pentoses fosfato, cujo enzima regulador é o G6PD (Figura 1.1) como foi discutido no ponto 4.2 (218) (219).

A relevância do GSH vem do seu papel como cofator de enzimas antioxidantes como os glutathione peroxidases. A depleção do GSH em leveduras tem sido também associada ao bloqueio da fase G1 do ciclo celular e à perda de atividade nucleótido reductase, que pode perturbar a fase S do ciclo celular. Para além disso, as necessidades das células eucariontes em GSH podem também estar relacionadas com a sua participação na biossíntese dos centros de 4Fe-4S essenciais para assegurar a

viabilidade celular. Os enzimas glutathione peroxidase de eucariontes, providenciam a principal resposta enzimática contra o *stress* oxidativo despoletado por lipoperóxidos e pelo peróxido de hidrogénio. As leveduras não contêm GPx clássicas, mas expressam três formas isomórficas de fosfo-glutathione-peroxidases (PhGPx), que reconhecem como substratos lipoperóxidos, derivados ou não, de fosfolípidos e que exercem um efeito protetor sobre os lípidos de membrana contra processos peroxidativos (218) (220).

A Figura 4.11 representa as atividades enzimáticas envolvidas no ciclo do glutathione, GR e GPx. Na Figura 4.11A pode observar-se um nível mais elevado da atividade GR em células respiratório-fermentativas comparativamente ao detetado em células respiratórias, um resultado pouco espectável uma vez que células que perderam funções mitocondriais específicas como o bloqueio do ciclo do citrato e a cadeia respiratória, deveriam exibir deficiência nas respostas antioxidantes enzimáticas, à semelhança do que foi descrito por Jamieson, 1998 (62), mas para *S.cerevisiae* em estado estacionário. O aumento da atividade GR em células respiratório-fermentativas sugere que para além do papel antioxidante, a regeneração do GSH poderá estar associada a outras funções biológicas, nomeadamente assistindo à proliferação celular, tal como indiciado pelo aumento da atividade G6PD discutido na Figura 4.10.

Na Figura 4.11A pode ainda observar-se que no ensaio A leveduras crescidas na presença de TiO₂-NP <25 sem choque térmico não apresentavam diferenças significativas na atividade GR detetada em células respiratório-fermentativas. Contudo, células expostas a TiO₂-NP <100 sem HS, apresentavam níveis de atividade GR estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos determinados para células crescidas em glicerol. Um resultado semelhante foi obtido para leveduras submetidas ao choque térmico, na presença ou na ausência de TiO₂-NP de qualquer das dimensões analisadas neste estudo, nos últimos 100 min da cultura. A presença de TiO₂-NP <100 sem choque térmico ou de TiO₂-NP <100 e <25 nm com HS (ensaio A) parece ser capaz de reverter os valores de atividade GR para níveis idênticos aos observados em células respiratórias.

Quando a exposição às nanopartículas de qualquer dimensão estudada sem choque térmico, choque térmico e TiO₂-NP <25 em HS aconteceu em simultâneo com a adição de glicose (ensaio B), a atividade GR permaneceu em níveis estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos determinados em células respiratórias. Surpreendentemente, observou-se um aumento desta atividade catalítica em *S. cerevisiae* crescidas na

presença de TiO₂-NP <100 nm e choque térmico para valores superiores aos registados em células respiratório-fermentativas ($p < 0,01$).

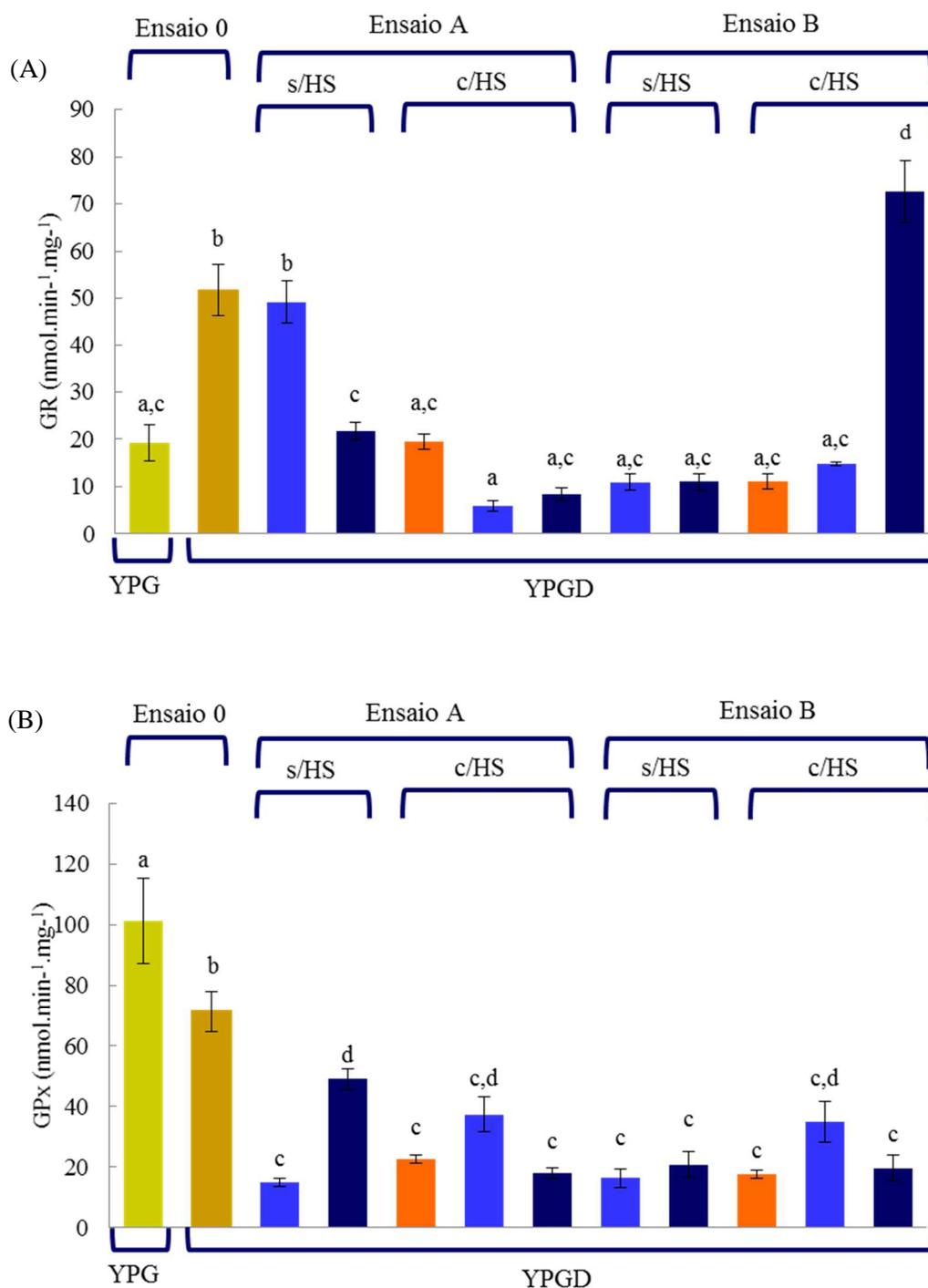


Figura 4.11 Atividade enzimática glutatióno redutase (A), e glutatióno peroxidase (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■ YPGD na ausência de TiO₂-NP ■ e na presença de TiO₂-NP <25 nm ■ e TiO₂-NP <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A Figura 4.11B, revela que a atividade GPx de células respiratório-fermentativas era estatisticamente inferior ($p < 0,01$) à atividade GPx de células respiratórias, resposta compatível com a repressão catabólica do ciclo do citrato e da cadeia respiratória descrita no ponto 4.2. A exposição a nanopartículas, ao choque térmico ou a nanopartículas e choque térmico, nos últimos 100 min da cultura (ensaio A), ou quando foi adicionada a glicose (ensaio B), provocou em qualquer dos casos um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da atividade GPx. O decréscimo desta atividade antioxidante mediada pelo ciclo do glutationo e em particular pelo enzima GPx poderá ter contribuído para perda da viabilidade celular, discutido anteriormente na Figura 4.2.

A dismutação do radical anião superóxido que se forma maioritariamente no mitocondrio ao nível da cadeia respiratória (NADH desidrogenases e complexo III), ciclo do citrato (α -cetoglutarato desidrogenase) e do citoplasma (NADH oxidases) é assegurada pelos enzimas superóxido dismutase (325). Leveduras respiratórias e respiratório-fermentativas exibem valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,01$) da atividade SOD1 (Figura 4.12A). A exposição a TiO_2 -NP < 25 nm na ausência de choque térmico, nos últimos 100 min do ensaio (ensaio A), provocou um decréscimo com significado estatístico ($p < 0,01$) desta atividade catalítica, efeito que não foi observado para as mesmas condições experimentais em culturas expostas a TiO_2 -NP < 100 . O choque térmico induziu um aumento significativo da atividade SOD1 para níveis superiores aos de células respiratórias e respiratório-fermentativas. Todavia a exposição simultânea ao choque térmico e TiO_2 -NP < 25 ou < 100 nm reverteram esse efeito para valores de atividade SOD1 idênticos aos detetados em *S. cerevisiae* expostas a TiO_2 -NP < 25 (Figura 4.12A).

Um perfil de resposta idêntico foi observado em leveduras sujeitas aos tratamentos do ensaio B, apesar de *S. cerevisiae* sujeitas apenas ao choque térmico, durante 200 min, ainda não apresentarem diferenças significativas ($p < 0,01$) de células respiratórias ou respiratório-fermentativas (Figura 4.12A). Os resultados permitem inferir um forte efeito modulador das nanopartículas de dióxido de titânio de qualquer dimensão e para qualquer tempo de exposição selecionado neste estudo, destaca-se ainda a forte capacidade destes materiais para contrariar o efeito do choque térmico em SOD1 de *S. cerevisiae*.

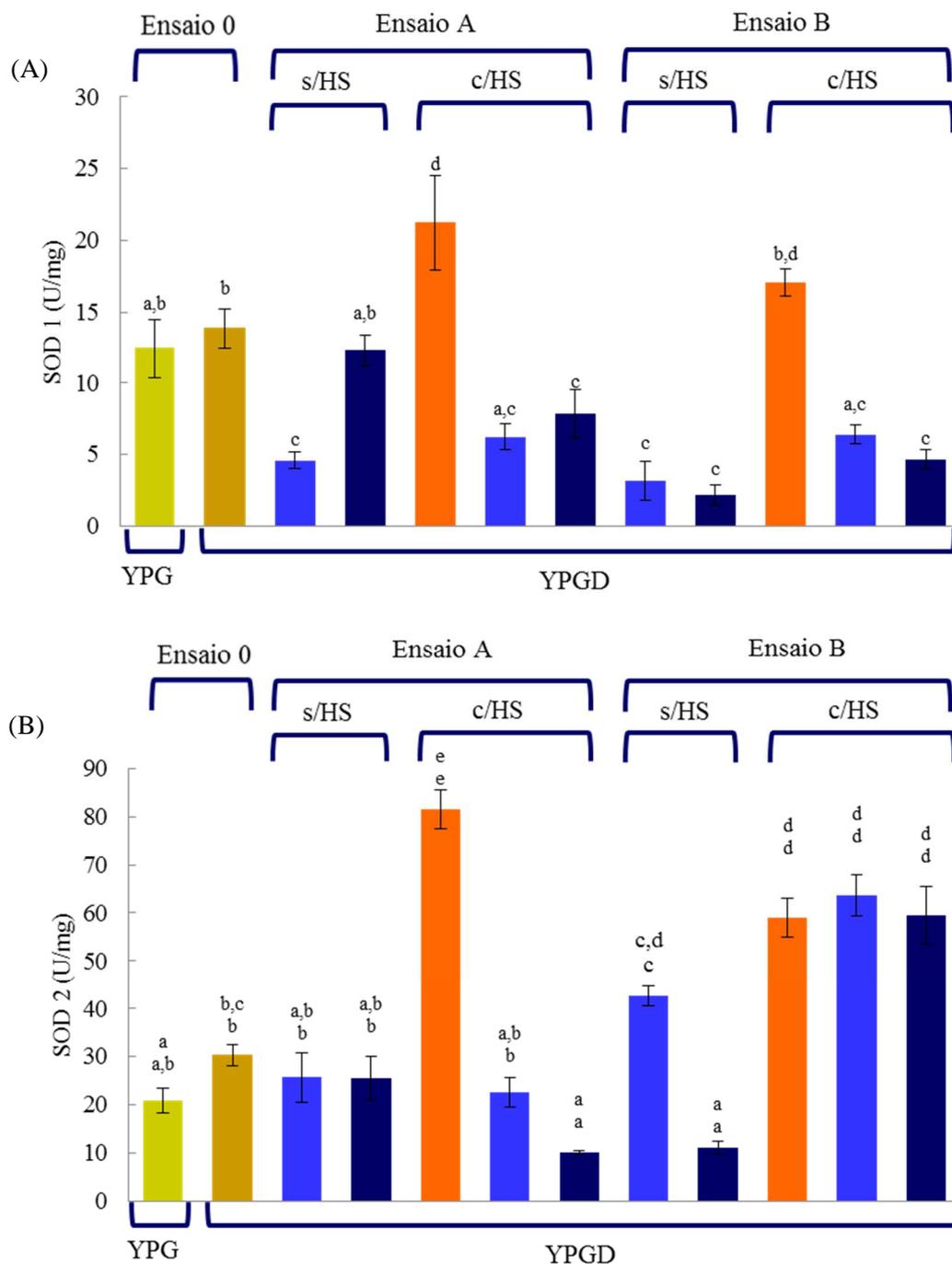


Figura 4.12 Atividade enzimática superóxido dismutase 1 (A), e superóxido dismutase 2 (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG (■), YPGD (■), YPGD na ausência de TiO₂-NP (■) e na presença de TiO₂-NP <25 nm (■) e TiO₂-NP <100 nm (■) em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$ - linha superior; $p < 0,05$ - linha inferior).

S. cerevisiae UE-ME₃ respiratórias e respiratório-fermentativas também apresentavam níveis de atividade SOD2 semelhantes ($p < 0,05$). A exposição a TiO₂-NP

<25 e <100 nm nos últimos 100 min de cultura (ensaio A) não perturbou esta atividade catalítica (Figura 4.12B). A referida Figura revela ainda que o choque térmico provocou um aumento altamente significativo da atividade SOD2. A exposição a TiO₂-NP em choque térmico reverteu esta resposta para níveis próximos dos controlos (TiO₂-NP <25) ou inferior em células respiratório-fermentativas (TiO₂-NP <100) ($p < 0,01$). A atividade SOD2 de células sujeitas ao ensaio B, expostas a TiO₂-NP <25 apresentavam níveis de atividade significativamente superiores aos de células respiratórias e respiratório-fermentativas ($p < 0,05$). O choque térmico e a exposição conjugada choque térmico/TiO₂-NP durante 200 min provocou um aumento significativo da atividade SOD2 para valores muito superiores aos detetados quer em células respiratórias quer em células respiratório-fermentativas.

A presença de TiO₂-NP no meio de cultura parece modular a resposta antioxidante das atividades catalíticas SOD 1 e SOD 2 (Figura 4.12) em choque térmico, mais evidente quando o tempo de exposição reporta aos últimos 100 min de cultura. Esta resposta dever-se-á eventualmente a perturbação na expressão de proteínas de resposta ao *stress* que interfiram na transcrição/tradução de superóxido dismutases.

A redução do peróxido de hidrogénio gerado pelos enzimas superóxido dismutase e outros processos celulares pode ser também mediada pelos hemoenzimas catalases. *S. cerevisiae* UE-ME₃ respiratórias exibiam níveis de atividade CTT1 (Figura 4.13A) significativamente superiores ($p < 0,01$) aos de leveduras respiratório-fermentativas. Leveduras sem choque térmico, na presença de nanopartículas de qualquer dimensão ou expostas a choque térmico e nanopartículas, nos últimos 100 min de cultura (ensaio A), não apresentavam atividade CTT1 com diferenças estatísticas da determinada em células respiratório-fermentativas, ainda que significativamente inferiores ($p < 0,01$) à atividade de células respiratórias. No ensaio B, apenas as células expostas ao choque térmico exibiam valores de atividade CTT1 significativamente diferentes dos registados em células respiratório-fermentativas sem diferença estatística ($p < 0,01$) de células respiratórias. A presença de TiO₂-NP no meio de cultura parece deste modo não perturbar a atividade catalase no citoplasma que apenas aumentou em resposta ao maior tempo de exposição em choque térmico.

Na Figura 4.13B não se observam diferenças com significado estatístico ($p < 0,01$) entre *S. cerevisiae* respiratórias e respiratório-fermentativas. A presença de TiO₂-NP no meio sem HS, nos últimos 100 min de cultura (ensaio A), não provocou

alterações significativas ($p < 0,01$) desta atividade enzimática. Todavia, o choque térmico na ausência e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ e < 100 nm provocou um aumento altamente significativo desta atividade catalítica em *S. cerevisiae* relativamente ao ensaio 0.

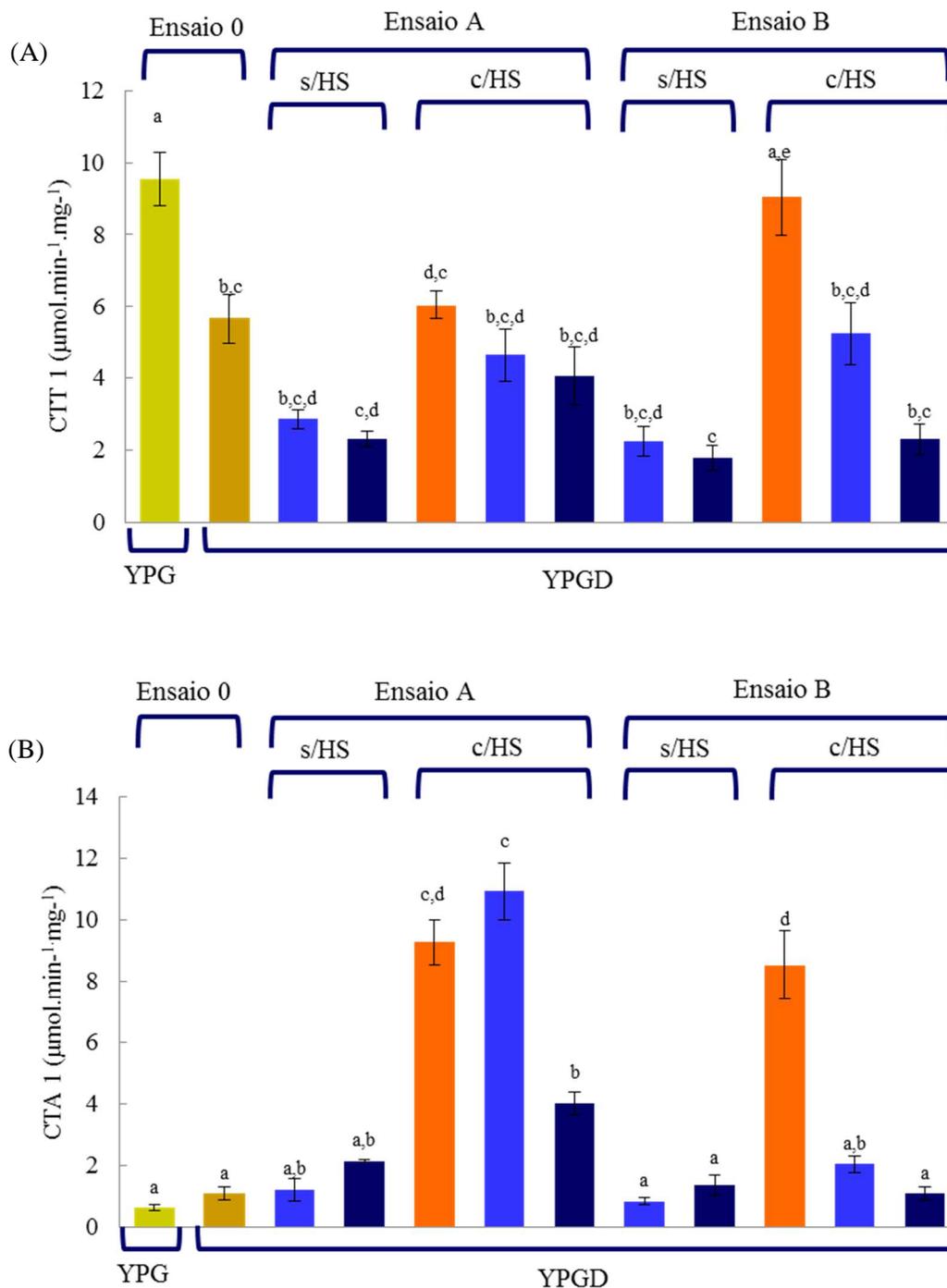


Figura 4.13 Atividade enzimática catalase citoplasmática (A), e catalase peroxissomal (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ ■ e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm ■ e $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm ■, em condições de choque térmico ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O ensaio B revelou que a presença de nanopartículas no meio de cultura na ausência ou na presença de choque térmico não produziu diferenças com significado estatístico ($p < 0,01$) dos valores detetados em *S. cerevisiae* respiratórias e respiratório-fermentativas. Apenas células sujeitas a choque térmico durante 200 min apresentavam valores próximos dos registados no ensaio A em choque térmico na presença e na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm. Apesar da expressão funcional da atividade catalase peroxissomal ser perturbada pelo choque térmico, apenas as $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm corroboram o efeito do choque térmico para o menor tempo de exposição (100 min) (Figura 4.13B).

O conteúdo em glutathione (Figura 4.14A) de células respiratório-fermentativas é significativamente inferior ($p < 0,01$) ao detetado em células respiratórias como esperado de acordo com a literatura (326). O contacto com $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm nos últimos 100 min de crescimento (ensaio A) repõe os níveis do tripéptido para valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,01$) ao de células respiratórias, resposta que não foi observada em células crescidas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 100$ nm. O choque térmico provocou um forte decréscimo do conteúdo intra-celular deste antioxidante, no ensaio A e B. A exposição simultânea ao choque térmico e nanopartículas não reverteu estatisticamente a queda abrupta de glutathione apesar de se observar essa tendência em células cultivadas na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ e < 100 nm em qualquer dos ensaios. Pode-se acrescentar ainda que no ensaio B, a exposição a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ de qualquer das dimensões estudadas, não altera o perfil do conteúdo em glutathione para níveis diferentes dos detetados em células respiratório-fermentativas. A resposta provocada por $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ em 100 min de exposição permite inferir uma reversão de metabolismo respiratório-fermentativo para respiratório, em termos do nível absoluto de GSH.

De acordo com o que foi referido anteriormente, o efeito antioxidante mediado pelo tripéptido γ -glutamil-cisteinil-glicina passa pela formação de disulfureto de glutathione. A Figura 4.14B exhibe um perfil de conteúdo em GSSG de células respiratórias e respiratório-fermentativas idêntico ao do glutathione descrito na Figura 4.14A. O perfil de resposta observado nos grupos de *S. cerevisiae* do ensaio A, expostas a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ nas dimensões escolhidas para este estudo, sujeitas ou não a choque térmico também se mostra idêntica ao descrito na Figura anterior. O contacto com $\text{TiO}_2\text{-NP} < 25$ nm nos últimos 100 min de crescimento (ensaio A) repõe os níveis do GSSG para valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,01$) ao de células respiratórias e apenas

nestas condições, tal como observado para o GSH (Figura 4.14A). Apesar do perfil de resposta a $\text{TiO}_2\text{-NP}$ sujeitas ou não a HS do ensaio B também ser idêntico ao descrito para o glutatióno (Figura 4.14A), a presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ aumenta o nível de GSSG para valores próximos dos detetados em células respiratórias.

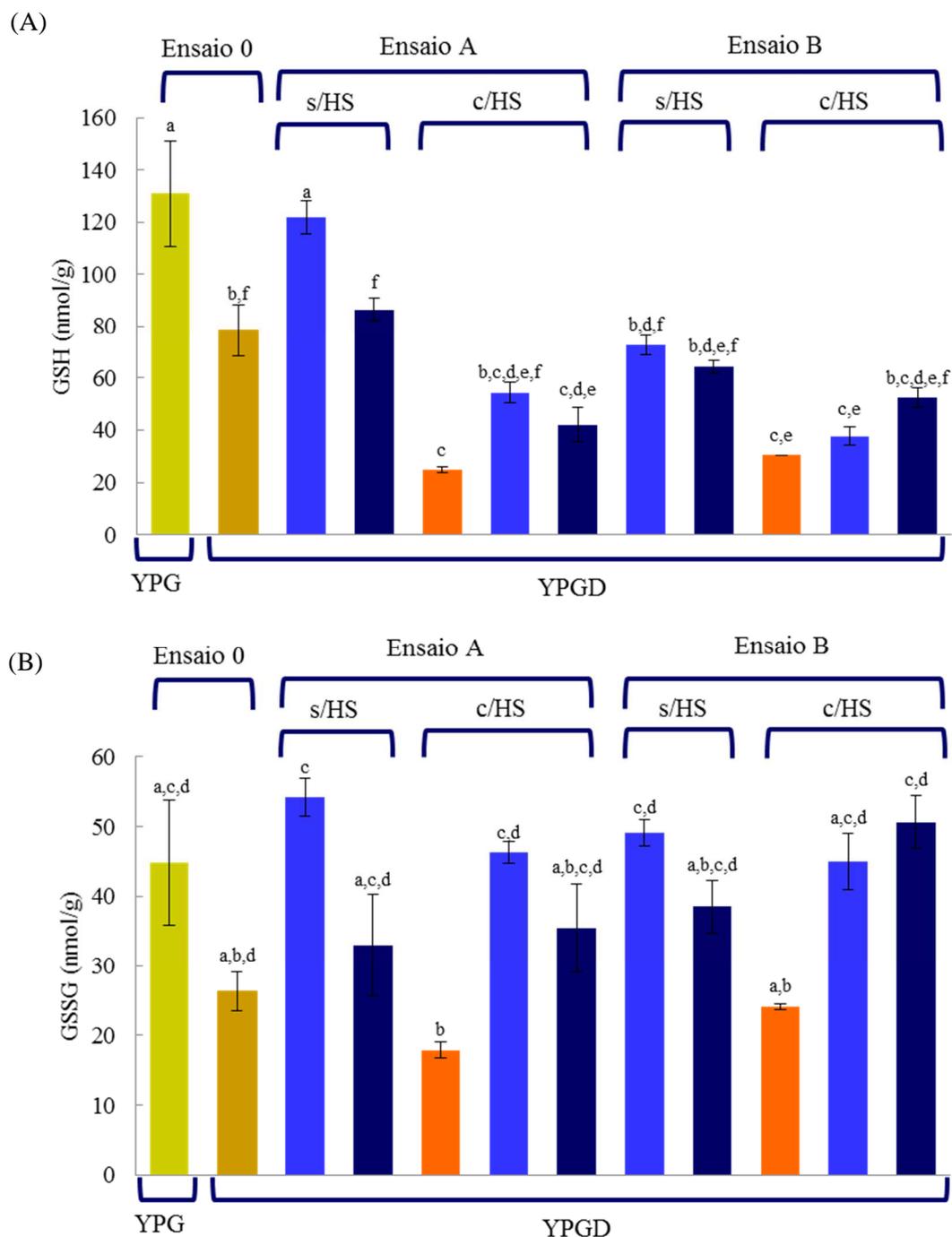


Figura 4.14 Conteúdo em glutatióno (A), e dissulfureto de glutatióno (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG ■, YPGD ■, YPGD na ausência de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ ■ e na presença de $\text{TiO}_2\text{-NP}$ <25 nm ■ e $\text{TiO}_2\text{-NP}$ <100 nm ■, em condições de choque térmico (HS) ou não, com exposição a estas variáveis durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O conteúdo em tióis totais não proteicos (GSH+GSSG) (Figura 4.15A) segue um perfil de resposta sobreponível ao discutido previamente para o conteúdo em glutatióno (Figura 4.14A). Assim, pode observar-se um aumento da disponibilidade em tióis totais não proteicos em *S. cerevisiae* expostas a TiO₂-NP <25 nm nos últimos 100 min de ensaio (ensaio A), valor idêntico ($p < 0,01$) ao quantificado em células exclusivamente respiratórias. Este efeito pode ser devido, em parte, ao aumento da capacidade da célula para regenerar GSH a partir do GSSG via GR e ao aumento do conteúdo em GSSG nas mesmas condições experimentais. No entanto a forte inibição da atividade catalítica GPx, eventualmente devido à interação entre as nanopartículas de menor dimensão e o centro ativo do metalo-enzima não explicam o aumento deste conteúdo. Condições favoráveis à conversão de GSH em GSSG por equilíbrio químico, poderão constituir uma justificação alternativa para o caso.

A capacidade antioxidante mediada pelo glutatióno pode ser estimada pela razão GSH/GSSG. A Figura 4.15B revela que este parâmetro determinado em leveduras respiratórias e respiratório-fermentativas não apresenta diferenças com significado estatístico ($p < 0,01$). Células expostas a TiO₂-NP de qualquer das dimensões estudadas no ensaio A, apresentavam valores de razão GSH/GSSG idênticos aos descritos para células respiratório-fermentativas. Contudo, esse parâmetro diminuiu significativamente em células crescidas em condições de choque térmico na ausência ou na presença de TiO₂-NP de qualquer das dimensões estudadas. A razão GSH/GSSG observada em *S. cerevisiae* de qualquer dos tratamentos realizados no ensaio B, não apresenta diferenças entre si, embora sejam inferiores aos de células respiratórias e respiratório-fermentativas (Figura 4.15B).

A maior parte dos grupos de células respiratório-fermentativas sujeitas aos tratamentos dos ensaios A e B não exibem diferenças significativas em termos de conteúdo em espécies reativas de oxigénio. Contudo, em *S. cerevisiae* cultivadas em choque térmico na ausência de TiO₂-NP ou na presença de TiO₂-NP <100 durante 200 min (ensaio B), detetou-se o valor mais baixo e o valor mais elevado para este parâmetro, respetivamente (Figura 4.16A).

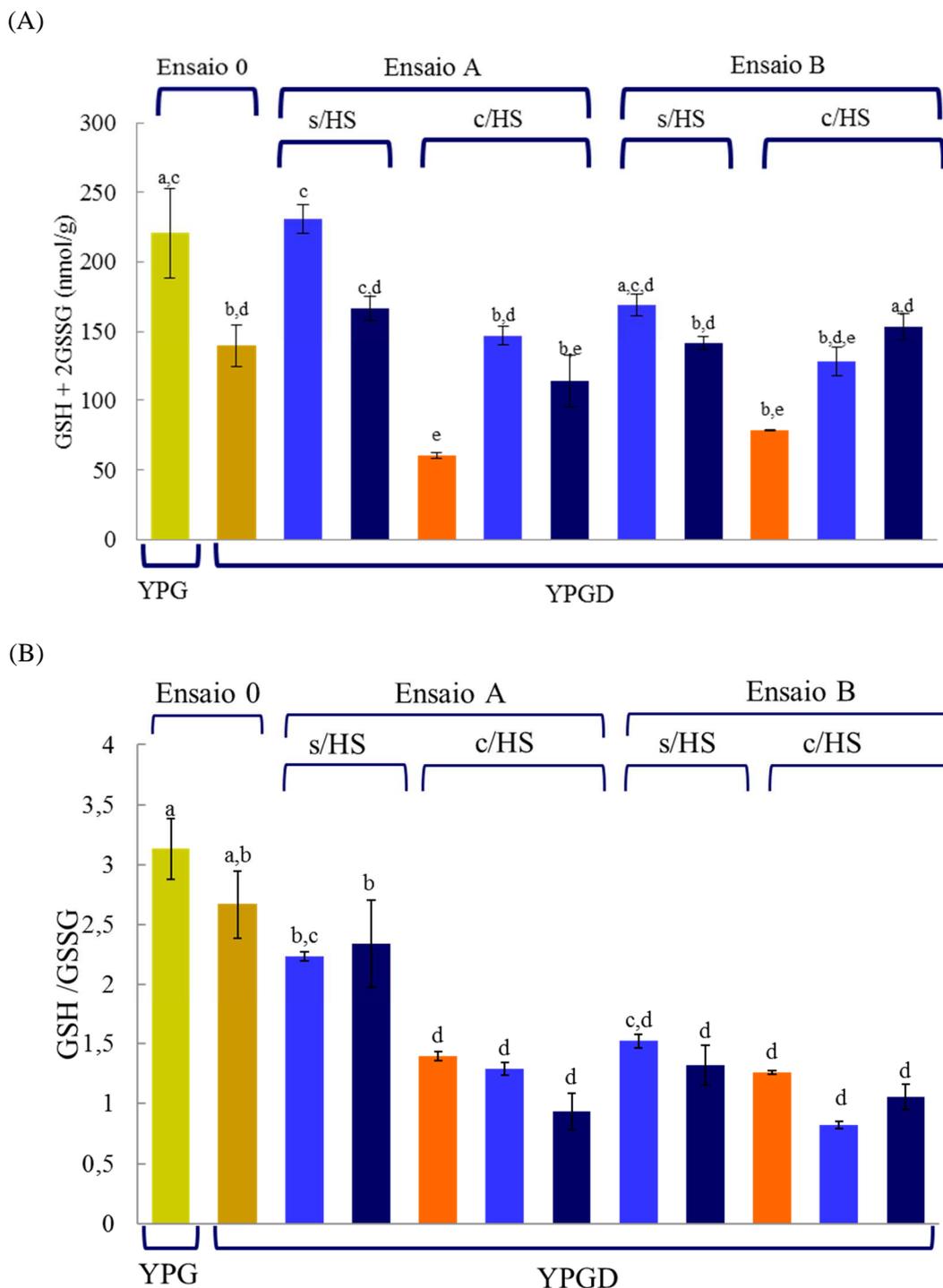


Figura 4.15 Conteúdo em GSH + 2GSSG (A), e GSH/GSSG (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG , YPGD , YPGD na ausência de TiO₂-NP e na presença de TiO₂-NP <25 nm e TiO₂-NP <100 nm em condições de choque térmico (HS) ou não, com exposição a estas variáveis durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Os níveis de ROS elevados que foram detetados em *S. cerevisiae* expostas simultaneamente ao choque térmico e ao nível de TiO₂-NP com dimensão mais elevada

poderão estar associados aos valores de razão GSH/GSSG baixos que foram comentados na Figura 4.15B, bem como com a perda de viabilidade celular comentada na Figura 4.1.

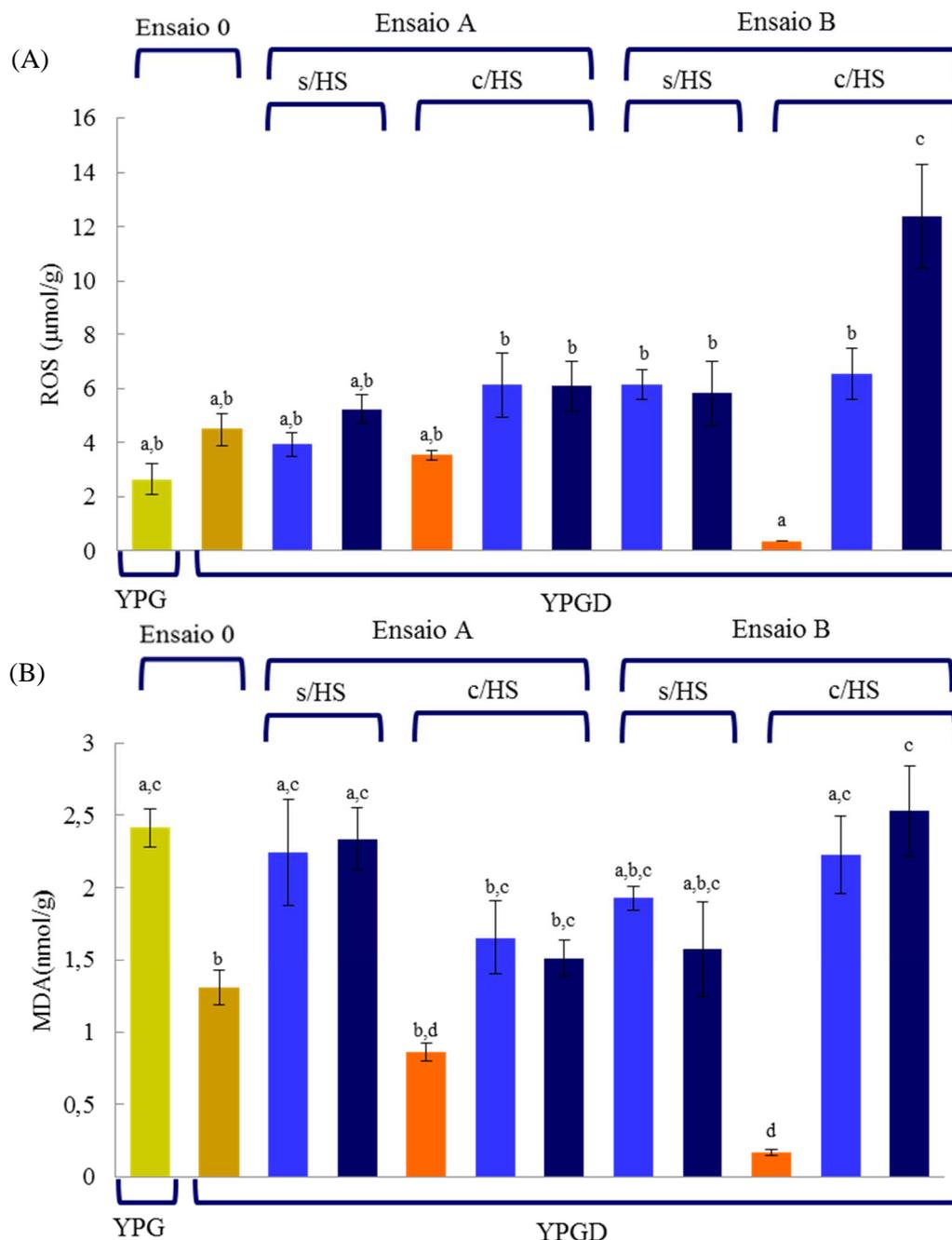


Figura 4.16- Conteúdo em espécies reativas de oxigénio (A), e malonaldeído (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG, YPGD, YPGD na ausência de TiO₂.NP e na presença de TiO₂.NP <25 nm e TiO₂.NP <100 nm, em condições de choque térmico (HS) ou não, durante 100 (ensaio A) ou 200 min (ensaio B). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

O conteúdo em malonaldeído intracelular é frequentemente descrito na literatura como um marcador de peroxidação lipídica e conseqüentemente de danos celulares (327). A partir da Figura 4.16B conseguimos observar que o nível de MDA presente em células respiratórias é significativamente superior ($p < 0,01$) ao detetado em células respiratório-fermentativas como seria espectável devido à repressão catabólica do metabolismo respiratório (37) (157). *S. cerevisiae* crescidas na presença de TiO_2 -NP de qualquer das dimensões estudadas exibiam níveis de MDA estatisticamente idênticos ($p < 0,01$) aos de células respiratórias. O choque térmico quer no ensaio A quer no ensaio B induziu uma queda com significado estatístico ($p < 0,01$) deste conteúdo intracelular. No entanto, células crescidas em choque térmico na presença de TiO_2 -NP manifestaram uma tendência contrária que assumiu significado estatístico nas leveduras do ensaio B, ou seja, aquelas que estiveram mais tempo em choque térmico e em contacto com as NPs metálicas. Estes resultados sugerem que os níveis de MDA assumem valores próximos dos detetados no metabolismo respiratório quando as células são sujeitas a choque térmico e presença de TiO_2 -NP de qualquer das dimensões, efeito que é potenciado se os fatores de *stress* estiverem presentes no meio de cultura desde o início do ensaio ao longo de 200 min, fator que constitui uma prova complementar da reversão/prevenção do metabolismo respiratório-fermentativo para respiratório induzido por nanopartículas de dióxido de titânio e choque térmico.

5. Conclusões

A exposição a TiO₂-NP <25 nm e <100 nm (5 µg/mL), acoplada ao choque térmico 28/40 bem como à presença de TiO₂-NP de menor dimensão sem choque térmico, permite a manutenção da taxa específica de crescimento 0,25 h⁻¹, característica de *S. cerevisiae* respiratórias contrária ao valor de 0,40 h⁻¹, comum a leveduras respiratório-fermentativas. Assim, a exposição inicial (200 min) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a TiO₂-NP (5 µg/mL) de menor dimensão sem e com HS e de maior dimensão com HS previne a manifestação do efeito Crabtree.

A presença de glicose no meio de cultura induziu um aumento significativo da viabilidade celular, compatível com o descrito na literatura para células respiratório-fermentativas.

S. cerevisiae UE-ME₃ que contactaram nos últimos 100 min do ensaio com TiO₂-NP <25 nm e <100 nm (5 µg/mL) em choque térmico, manifestaram um decréscimo significativo da viabilidade celular para valores idênticos ou inferiores aos determinados em *S. cerevisiae* respiratórias. *S. cerevisiae* com exposição inicial a TiO₂-NP <25 e <100 nm (5 µg/mL), na ausência ou na presença de HS (ensaio B) apresentaram níveis de viabilidade celular inferiores ou idênticos aos registados em células respiratórias. As leveduras crescidas na presença de NP <100 com choque térmico, exibiam o menor valor de viabilidade celular. A perda de viabilidade celular aqui descrita sugere que as TiO₂-NP poderão reverter e /ou prevenir o efeito Crabtree.

Os níveis de atividade ALP de *S. cerevisiae* cultivadas em meio YPGD e expostas inicialmente ou nos últimos 100 min a choque térmico, na ausência e na presença de TiO₂-NP (<25 nm, <100 nm) foram idênticos aos detetados em células respiratórias (p <0,01). A presença de TiO₂-NP (5 µg/mL) e choque térmico no meio de cultura revertem ou preveniram o perfil de disponibilização do potencial químico, via ALP das ligações fosfato, característico de células respiratório-fermentativas, facto que justifica em parte a perda de viabilidade celular previamente descrita.

A presença de glicose no meio de cultura induziu um aumento da atividade hexocinase (p <0,05), contribuindo para um aumento da taxa de fermentação aeróbia, bem como da produção de equivalentes redutores pela via das pentoses fosfato, úteis à biossíntese *de novo* de lípidos e à resposta antioxidante que suporta o aumento da viabilidade celular comentado anteriormente.

A adição de TiO₂-NP (5 µg/ mL; <25 nm, <100 nm) induziu aumento da atividade HXK para níveis superiores aos detetados em células respiratórias e

respiratório-fermentativas. O choque térmico e/ou a exposição inicial e nos últimos 100 min do ensaio a TiO₂-NP (<25 nm, <100 nm), diminuíram os níveis desta atividade catalítica para valores inferiores aos determinados em células respiratórias, observando-se um efeito conjugado que minimiza o fluxo de carbono e de equivalentes redutores pelas vias glicolítica e PP.

A presença de glicose no meio de cultura levou a um aumento da atividade piruvato cinase resposta expectável em leveduras Crabtree positivas.

O choque térmico e a adição de TiO₂-NP (<25 ou <100 nm) com ou sem choque térmico, nos últimos 100 min do ensaio, reverteram o perfil de resposta da atividade PYK para valores próximos dos encontrados em células respiratórias (p <0,01).

Apesar de a exposição inicial de *S. cerevisiae* a TiO₂-NP <25, sem choque térmico, ter aumentado a atividade PYK para níveis próximos dos de *S. cerevisiae* respiratório-fermentativas, a presença de TiO₂-NP <100 nm ou de TiO₂-NP <25 em choque térmico, previnem o efeito da transição do metabolismo respiratório para respiratório-fermentativo induzido pela glicose. Curiosamente, a exposição a TiO₂-NP <100 e choque térmico contrariou o perfil de resposta descrito para as duas situações anteriores, elevando os níveis de atividade PYK para valores próximos dos detetados em leveduras respiratório-fermentativas.

A adição de glicose provocou um aumento da atividade PDC, um dos enzimas reguladores da fermentação alcoólica, confirmando a manifestação do efeito Crabtree nesta estirpe de *S. cerevisiae*.

A exposição a TiO₂-NP <100, nos últimos 100 min de cultura não perturbou a atividade PDC de células respiratório-fermentativas, não revertendo assim o metabolismo fermentativo aeróbio induzido pela glicose, resposta contrária à observada com TiO₂-NP <25, sem choque térmico e TiO₂-NP < 25 e <100 (5 µg/mL), em choque térmico, cuja atividade PDC correspondia aos valores detetados em células respiratórias. No ensaio B o perfil de resposta à exposição inicial a TiO₂-NP com e sem choque térmico foi idêntico ao descrito para o ensaio A, exceto a resposta celular devido à exposição a TiO₂-NP <25, em choque térmico que não evita a transição do metabolismo respiratório para respiratório-fermentativo.

A adição de glicose ao meio de cultura induziu um acréscimo da atividade álcool desidrogenase efeito que permite inferir um desvio metabólico para fermentação

alcoólica induzido pela nova fonte de carbono, resposta que confirma de novo o efeito Crabtree.

S. cerevisiae UE-ME₃ com exposição inicial ou nos últimos 100 min a TiO₂-NP <25 nm ou <100 nm, sem choque térmico não manifestavam alterações com significado estatístico ao metabolismo respiratório-fermentativo. No entanto, o choque térmico na presença de TiO₂-NP <25 nm ou <100 nm revertem ou previnem o efeito de Crabtree em *S. cerevisiae*.

A atividade lactato desidrogenase DLD3 mostrou-se mais elevada em células respiratórias, confirmando-se a repressão desta atividade catalítica pela glicose.

A adição de TiO₂-NP <25 ou <100 manteve a atividade DLD3 em níveis idênticos aos de células respiratório-fermentativas, o mesmo ocorrendo em células sujeitas a choque térmico na ausência ou na presença de TiO₂-NP <100 nm nos últimos 100 min de cultura. Contudo, a exposição a TiO₂-NP <25 nm, em choque térmico provocou um aumento da DLD3 para níveis idênticos aos de células respiratórias, facto que sugere uma reversão do efeito inibitório induzido pela glicose em células respiratório-fermentativas.

O perfil de resposta do enzima DLD3 a TiO₂-NP em choque térmico, durante 200 min foi idêntico ao descrito para o ensaio A, com exceção das leveduras sujeitas ao choque térmico na presença de TiO₂-NP <100 nm durante o mesmo período de tempo, cujo efeito inibitório exercido pela glicose parece ter sido potenciado pelo efeito conjugado das TiO₂-NP e choque térmico.

S. cerevisiae UE-ME₃ crescidas na presença de glicose e glicerol apresentavam níveis de atividade CS e SDH inferiores aos determinados em leveduras que apenas utilizaram glicerol como fonte de carbono. Esta resposta permite inferir um bloqueio pela glicose do ciclo do citrato, com perturbação da transferência de equivalentes redutores sob a forma de FADH₂ para a cadeia respiratória e consequente inibição da respiração celular em condições aeróbias.

A exposição de *S. cerevisiae* respiratório-fermentativas a TiO₂-NP <25 nm, nos últimos 100 min do ensaio, reverteu parcialmente a inibição das atividades CS e SDH induzida pela presença de glicose no meio. Contudo, para TiO₂-NP <100 nm observou-se o efeito inverso, ocorrendo um decréscimo das referidas atividades enzimáticas, acentuando-se o bloqueio catabólico induzido pela glicose.

Curiosamente, o choque térmico aplicado durante 200 min ou nos últimos 100 min do ensaio provocou um decréscimo das atividades CS e SDH para níveis vestigiais. Todavia, a exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a TiO₂-NP, em choque térmico nos últimos 100 min do ensaio, reverteu esse efeito deletério, conservando os níveis de atividade próximos dos valores determinados em células respiratório-fermentativas, ainda que estatisticamente inferiores para NP <25 nm, e estatisticamente superiores para NP <100 nm.

O perfil de resposta da atividade SDH de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a TiO₂-NP <25 ou <100, sem choque térmico, durante 200 min, foi idêntico ao descrito anteriormente para os últimos 100 min de exposição, com prevenção da sua inibição pela glicose. Contudo, os níveis de atividade CS para o mesmo tratamento permaneceram idênticos aos de células respiratório-fermentativas. Surpreendentemente, *S. cerevisiae* UE-ME₃ sujeitas a choque térmico na presença de TiO₂-NP <25 e <100 exibiam níveis de atividade SDH superiores aos determinados quer em células respiratórias quer em células respiratório-fermentativas. A exposição de *S. cerevisiae* a TiO₂-NP e choque térmico poderá ter contribuído para evitar o bloqueio respiratório induzido pela glicose ao nível da CS e SDH, facilitando o fluxo de eletrões para a cadeia respiratória.

A adição de glicose ao meio de cultura despoletou um decréscimo da atividade NDE1 comparativamente com aquela que foi determinada em células que utilizaram apenas glicerol como fonte de carbono. O resultado é compatível com a repressão pela glicose do metabolismo respiratório-oxidativo de *S. cerevisiae*.

A exposição de *S. cerevisiae* a TiO₂-NP <25 e < 100, nos últimos 100 min do ensaio, reverteu parcialmente os níveis de atividade NDE1 para valores superiores aos detetados em células respiratório-fermentativas.

O choque térmico e a exposição a TiO₂-NP <25 e <100, conservou os níveis de atividade NDE1 idênticos aos detetados em células respiratório-fermentativas.

S. cerevisiae expostas a TiO₂-NP <25 e <100 durante 200 min, sem choque térmico, conservaram os níveis de atividade NDE1 idênticos aos determinados em células respiratório-fermentativas. Embora o choque térmico tenha diminuído esta atividade catalítica para níveis quase vestigiais, a sua aplicação simultânea com TiO₂-NP <100 nm reverteu a repressão catabólica exercida pela glicose, alcançando valores próximos dos determinados em células respiratórias, confirmando assim, a tendência detetada em culturas com TiO₂-NP < 25 em choque térmico.

A adição de glicose ao meio de cultura afetou negativamente a atividade enzimática malato desidrogenase mitocondrial (MAE1, MDH1, MDH3), sem contudo perturbar o nível de atividade malato desidrogenase citoplasmática (MDH2). De acordo com a literatura, o efeito observado sobre os enzimas mitocondriais reflete um decréscimo das necessidades em coenzima NADH oxidáveis ao nível da cadeia respiratória para gerar ATP, devido ao bloqueio do ciclo do citrato e da própria cadeia respiratória.

A adição de nanopartículas <100 nm, durante 200 min, sem choque térmico, reverteu os níveis de atividade malato desidrogenase mitocondrial (MAE1, MDH1, MDH3) para valores próximos dos registados em células respiratórias, devido provavelmente à biossíntese *de novo* de resíduos acilo que podem ter contribuído para o aumento da taxa específica de crescimento μ .

A adição de nanopartículas <100 nm, nos últimos 200 min do ensaio, com choque térmico, elevou a atividade malato desidrogenase citoplasmática (MDH2) para níveis superiores aos registados quer em células respiratórias, quer em células respiratório-fermentativas, efeito justificável pelo aumento da taxa de oxidação de equivalentes redutores, sob a forma de NAD(P)H catalisada pelos enzimas GR ou NDE1.

A presença de glicose no meio de cultura levou ao aumento da atividade G6PD efeito compatível com a inibição do fluxo de carbono, via ciclo do citrato, já referido anteriormente, associado a um aumento do fluxo de equivalentes redutores pela via das pentoses fosfato.

A exposição a TiO₂-NP <100 nm, sem choque térmico (ensaio A) provocou um decréscimo da atividade enzimática G6PD para níveis idênticos aos observados em células respiratórias.

O choque térmico nos últimos 100 min da cultura, na ausência e na presença de TiO₂-NP <25 nm ou <100 nm provocou um decréscimo da atividade G6PD para níveis inferiores aos encontrados quer em células respiratórias, quer em células respiratório-fermentativas, alteração metabólica fragilizante das defesas antioxidantes e da capacidade anabólica implicada na biossíntese de resíduos acilo por *S. cerevisiae* UEM₃ que pode justificar parcialmente a perda de viabilidade celular descrita anteriormente.

S. cerevisiae UE-ME₃, expostas durante 200 min a TiO₂-NP <100 e choque térmico estabilizaram a atividade G6PD em níveis idênticos aos de células respiratórias, prevenindo a sua evolução para metabolismo respiratório-fermentativo.

S. cerevisiae UE-ME₃ respiratório-fermentativas exibiam níveis de atividade GR superiores aos de células respiratórias, condição comum a marcadores de proliferação celular, como a taxa específica de crescimento, viabilidade celular e atividade ALP e G6PD, previamente descritos.

Leveduras expostas a TiO₂-NP <25 nm nos últimos 100 min de ensaio, sem choque térmico, apresentavam valores de atividade GR semelhantes, aos de leveduras células respiratório-fermentativas.

Os níveis de atividade GR de *S. cerevisiae* expostas nos últimos 100 min de ensaio a TiO₂-NP <100 nm, sem choque térmico ou de *S. cerevisiae* sujeitas a choque térmico, na presença ou na ausência de TiO₂-NP <25 nm e <100 nm retomaram os níveis observados em células respiratórias.

A exposição durante 200 min a TiO₂-NP <25 nm e <100 nm, com e sem choque térmico, manteve a atividade GR em níveis estatisticamente idênticos aos determinados em células respiratórias, exceto em leveduras crescidas na presença de NP <100 nm e choque térmico cuja atividade aumentou para níveis superiores aos registados em células respiratório-fermentativas, resposta comum com alterações nas atividades MDH2 e NDE1 que pode ter contribuído para o fluxo de equivalentes redutores envolvidos na prevenção da repressão catabólica exercida pela glicose.

S. cerevisiae respiratório-fermentativas mostravam níveis de atividade GPx inferiores aos detetados em células respiratórias, situação expectável pelo abrandamento metabólico do ciclo do citrato e da cadeia respiratória, fontes maioritárias de ROS.

A exposição a TiO₂-NP, ao choque térmico ou a TiO₂-NP e choque térmico nos últimos 100 min ou durante os 200 min da cultura, provocou um decréscimo da atividade antioxidante GPx que eventualmente contribuiu para a perda de viabilidade celular, previamente discutido para estas condições de ensaio.

S. cerevisiae UE-ME₃ respiratórias e respiratório-fermentativas exibiam valores da atividade SOD1, citoplasmáticas, semelhantes. A exposição de *S. cerevisiae* respiratório-fermentativas a choque térmico 28/40 °C, quer nos últimos 100 min quer durante os 200 min do ensaio, não alterou a atividade SOD1. Embora a exposição a TiO₂-NP <100 nm na ausência de choque térmico não tenha perturbado esta atividade

catalítica, o contacto com TiO₂-NP <25 nm, neste tempo de exposição ou com TiO₂-NP <25 nm e <100 nm durante 200 min, ou ainda com TiO₂-NP de qualquer das dimensões aqui consideradas, em choque térmico, provocou um decréscimo da atividade SOD1 para níveis inferiores aos detetados em células respiratórias e respiratório-fermentativas, um forte efeito modulador de TiO₂-NP < 25 nm ou < 100 nm sobre a atividade SOD1 de *S.cerevisiae* UE-ME₃, para qualquer tempo de exposição selecionado neste estudo que contraria o efeito activador provocado pelo choque térmico.

A atividade SOD2 de *S. cerevisiae* UE-ME₃ respiratórias era idêntica à de células respiratório-fermentativas. O choque térmico 28/40°C aplicado nos últimos 100 min (Ensaio A), ou durante 200 min (Ensaio B), na ausência ou na presença de TiO₂-NP <25 e <100, induziu um aumento da atividade SOD2 para valores superiores aos detetados quer em células respiratórias quer em células respiratório-fermentativas, alteração que no caso particular de *S. cerevisiae* tratadas com TiO₂-NP <100, em choque térmico coincide por um aumento da actividade catalíticas SDH, dos níveis de ROS e de MDA, bem como, um decréscimo das atividades PDC e ADH, compatíveis com a manutenção do metabolismo respiratório, em culturas onde a presença de glicose como fonte de carbono deveria exercer a sua repressão.

S. cerevisiae UE-ME₃ respiratório-fermentativas exibiam níveis de atividade CTT1 inferiores aos de leveduras respiratórias. A exposição a TiO₂-NP na ausência ou na presença de choque térmico, não perturbou a atividade catalase citoplasmática.

Os níveis de atividade CTA1 de *S. cerevisiae* respiratórias e respiratório-fermentativas não exibiam diferenças com significado estatístico. Quando o choque térmico foi aplicado nos últimos 100 min ou durante os 200 min de ensaio, bem como a exposição a TiO₂-NP < 25 e < 100 nos, últimos 100 min de ensaio ocorreu uma indução da actividade CTA1 para níveis superiores aos detetados quer em células respiratórias, quer em células respiratório-fermentativas. Apesar da expressão funcional da atividade catalase peroxissomal ser perturbada pelo choque térmico, apenas as TiO₂- NP <25 no menor tempo de exposição (100min) permitem a manutenção desse efeito.

A presença de glicose no meio de cultura não provocou alterações com significado estatístico no ambiente redox modulado pelo glutatióno (razão GSH/GSSG) de *S. cerevisiae* UE-ME₃.

Células expostas nos últimos 100 min de cultura, a TiO₂-NP <25 nm, apresentavam valores de razão GSH/GSSG idênticos aos descritos para células

respiratório, contudo, este parâmetro diminuiu significativamente em células crescidas em condições de choque térmico na ausência ou na presença de TiO₂-NP.

S. cerevisiae expostas a choque térmico (28/40°C) ou a TiO₂-NP <25 nm e <100 nm, sem e com choque térmico, ao longo de 200 min, não exibiam entre si, diferente capacidade antioxidante mediada pelo glutatono, apresentando valores inferiores aos detetados quer em células respiratórias, quer em células respiratório-fermentativas. A transição redutor-oxidante do ambiente celular que acabou de ser descrita, sugere indução de *stress* oxidativo, pelo choque térmico e ou pelas TiO₂-NP, suficiente para justificar a perda de viabilidade celular previamente assinalada.

S. cerevisiae UE-ME₃ submetidas a choque térmico na presença de TiO₂-NP <100 nm, durante 200 min exibiam o conteúdo mais elevado de ROS de todos os tratamentos realizados, facto que estará implicado na perda de capacidade antioxidante mediada pelo glutatono que eventualmente condicionou a perda da viabilidade celular assinalada na parte inicial deste ponto.

S. cerevisiae respiratório-fermentativas possuíam níveis de MDA inferiores aos de células respiratórias, uma alteração expectável devido ao provável decréscimo de danos oxidativos, como consequência de repressão do metabolismo respiratório pela glicose.

A exposição a TiO₂-NP <25 nm e <100 nm, nos últimos 100 min do ensaio, fez disparar o conteúdo em MDA para níveis idênticos aos detetados em células respiratórias.

O choque térmico aplicado nos últimos 100 ou durante os 200 min de ensaio, provocaram um decréscimo do conteúdo celular em MDA, resposta justificável pela pequena quantidade de material celular disponível devido à perda de viabilidade celular detetada nessas condições culturais.

S. cerevisiae crescidas em choque térmico na presença de TiO₂-NP <25 nm e <100 nm, durante 200 min, assumiram valores de MDA estatisticamente idênticos aos de células respiratórias. Esta resposta permite inferir que o efeito combinado: choque térmico e exposição a TiO₂-NP <100 nm manteve os níveis de danos celulares, gerados pela peroxidação lipídica, próximos dos que foram detetados em leveduras respiratórias.

6. Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a estirpe vínica nativa UE-ME₃ de *S. cerevisiae* comportou-se como uma levedura Crabtree positiva (319), uma vez que a presença de glicose no meio de cultura conduziu a um aumento da taxa específica de crescimento e da viabilidade celular, eventualmente sustentado pelo: *i*) aumento da disponibilização do potencial químico de ligações fosfato, via fosfatase alcalina; *ii*) ativação da via glicolítica, inferida pelo aumento das atividades enzimáticas hexocinase e piruvato cinase; *iii*) aumento da taxa de regeneração de NAD⁺, evidenciado pelo aumento das atividades catalíticas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase; *iv*) decréscimo das atividades enzimáticas citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, do ciclo do citrato/cadeia respiratória e atividade NADH desidrogenase externa da cadeia respiratória; *v*) aumento da atividade glicose-6-fosfato desidrogenase, fonte robusta de equivalentes redutores que assiste à biossíntese *de novo* de lípidos e consequentemente à proliferação celular; *vi*) atenuação de sistemas de resposta antioxidantes que envolvem enzimas glutatióno peroxidase e catalase citoplasmática, bem como as propriedades redutoras do tripéptido glutatióno; *vii*) decréscimo da ocorrência de danos oxidativos, estimados pelos níveis intracelulares de malonaldeído, sinais que evidenciam o bloqueio catabólico do ciclo do citrato e da cadeia respiratória, com deslocamento do fluxo de carbono e de equivalentes redutores para a fermentação alcoólica.

A exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a nanopartículas de dióxido de titânio com diâmetro molecular inferior a 100 nm, em choque térmico, durante 200 min, parece ter evitado a evolução do metabolismo respiratório, dominante quando o glicerol constitui fonte exclusiva de carbono, para respiratório-fermentativo que tipicamente se manifesta quando também está presente glicose no meio de cultura. Os fenómenos fisiológicos referidos na afirmação anterior são evidenciados pela conservação da taxa específica de crescimento, das atividades enzimáticas fosfatase alcalina e álcool desidrogenase e dos níveis de danos oxidativos estimados pelo conteúdo em malonaldeído de leveduras sujeitas ao referido tratamento, em valores próximos dos detetados em células respiratórias, bem como, pelo decréscimo da viabilidade celular, das atividades catalíticas hexocinase, marcadora da via glicolítica, piruvato desidrogenase, regulador do fluxo de carbono *via* pela fermentação alcoólica, glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima chave da via das pentoses fosfato que assiste vias anabólicas, superóxido dismutase, antioxidante citoplasmático, e ainda pelo aumento das atividades succinato

desidrogenase, malato desidrogenase, marcadoras do fluxo de carbono pelo ciclo do citrato/cadeia respiratória, NADH desidrogenase, marcador do fluxo de equivalentes redutores pela cadeia respiratória e pelo aumento do conteúdo em espécies reativas de oxigénio e dos danos celulares, bons indicadores de ativação do metabolismo respiratório. Provavelmente o comportamento newtoniano de nanopartículas de dióxido de titânio com dimensão molecular inferior a 100 nm e área superficial superior a 14,0 m²/g, não dispensa a disponibilização de energia sob a forma de calor, até valores próximos do limite da sobrevivência celular desta estirpe de leveduras, para exercer a sua ação preventiva da transição metabólica determinada pela glicose, com consequente aumento da sua capacidade replicativa, sustentada pelo ATP gerado por vias alternativas ao metabolismo respiratório como a fermentação alcoólica, ou a via das pentoses fosfato, distúrbio metabólico frequentemente descrita em células cancerígenas e referenciada como efeito Warburg (328) (29).

Além disso, foi demonstrado por Andrew E. Pelling e colaboradores, a ocorrência de um movimento oscilatório nanomecânico na parede de leveduras, crescidas em meio YPD até ao final da fase exponencial que se manifesta de forma sistemática e que aumenta significativamente com a temperatura, através de uma variação da frequência desde 0,9 kHz a 22°C até 1,6 kHz a 30 °C (329). A forte dependência da frequência de oscilação com a temperatura e o estado metabólico levou esses autores a sugerirem que o movimento nanomecânico da parede é conduzido biologicamente e necessita de ATP. Tal facto parece implicar que forças de elevada dimensão, podem ser geradas em células de levedura pela ação de diversas proteínas que atuam de forma concertada e cooperativa. A velocidade deste movimento, a sua resposta a inibidores metabólicos e a dependência da temperatura segundo o modelo de Arrhenius são completamente consistentes com a ocorrência de processos metabólicos ativos que controlam o movimento nanomecânico. Este fenómeno pode corresponder a vias de comunicação celular ou a mecanismos de bombeamento iónico, através dos quais as células de levedura complementam a difusão passiva de nutrientes e/ou controlam o transporte de materiais através da parede celular (320). A dimensão das nanopartículas de óxido de titânio <100 nm, permite especular que o choque térmico poderá ter alterado o movimento nanomecânico da parede de forma a facilitar a passagem das nanopartículas através da parede celular de *S. cerevisiae*, ao facilitar o seu contacto com a membrana celular.

Por outro lado, nanopartículas de maior dimensão (< 100 nm) e conseqüente menor área superficial necessitam do efeito despoletado pelo choque térmico para promover um maior deslocamento de cargas que facilite a interação com a membrana e conseqüentemente a sua internalização/retenção. Provavelmente, o choque térmico terá contribuído para ampliar a hidrofobicidade das nanopartículas menores que 100 nm, facilitando o seu alinhamento na proximidade da membrana e o estabelecimento de interações não específicas que promovem a sua internalização por endocitose (300) (321).

A adição de nanopartículas de dióxido de titânio com dimensão molecular inferior a 25 nm a *S. cerevisiae* UE-ME₃, mantidas 100 min em condições Crabtree, despoletou a reversão parcial do referido efeito. A transição do metabolismo respiratório-fermentativo para maioritariamente respiratório pode ser observada nomeadamente pelo decréscimo da atividade piruvato descarboxilase, enzima chave da fermentação alcoólica e da atividade álcool desidrogenase, bem como um aumento significativo das atividades citrato sintase e succinato desidrogenase, envolvidas no ciclo do citrato/cadeia respiratória, NADH desidrogenase externa 1 pertencente à cadeia de transporte de electrões mitocondrial, bem como dos níveis intracelulares do tripéptido glutationo, do seu derivado dissulfureto de glutationo e de danos celulares estimados pelo contendo em malonaldeído.

Surpreendentemente, a adição de nanopartículas de dióxido de titânio com diâmetro molecular inferior a 25 nm, em choque térmico, provocou um decréscimo da viabilidade celular, bem como das atividades enzimáticas fosfatase alcalina, hexocinase, piruvato cinase, piruvato descarboxilase, glutationo redutase e um aumento das atividades catalíticas lactato desidrogenase e catalase peroxissomal, sem contudo perturbar as atividades enzimáticas mitocondriais implicadas no metabolismo respiratório como citrato sintase, succinato desidrogenase, do ciclo do citrato e NADH desidrogenase, da cadeia respiratória. Como a reversão parcial do metabolismo fermentativo, não foi acompanhada pela reposição do fluxo de carbono e de equivalentes redutores sob a forma de NADH pelas vias respiratórias, pode levar a supor que a energia cinética devido ao choque térmico nas TiO₂-NP <25 nm, foi capaz de romper o seu mecanismo de ação.

Assim, este estudo revelou que sob o ponto de vista da reversão do efeito de Crabtree, a exposição a nanopartículas de dióxido de titânio <25 nm, de comportamento

regido pela mecânica quântica, foi mais eficaz do que qualquer um dos restantes ensaios uma vez que ocorreu decréscimo da taxa específica de crescimento e dos enzimas envolvidos na fermentação alcoólica, resposta que foi acompanhada pelo aumento de algumas actividades enzimáticas reguladoras do ciclo do citrato/cadeia respiratória, vias geradoras de radical anião superóxido, uma fonte de *stress* oxidativo, parcialmente compensado pelo aumento dos níveis intracelulares do tripéptido glutationo, insuficiente, no entanto, para evitar a ocorrência de danos oxidativos, típicos do metabolismo respiratório (276). Considerando que o local primário de interação das nanopartículas com as leveduras é a parede celular, e que a sua semi-permeabilidade é determinada pela dimensão de poros cujo diâmetro molecular varia entre 5 e 20 nm, pode admitir-se que este peneiro molecular poderá ter contribuído para facilitar a internalização da TiO₂-NP de menor dimensão justificando em parte as respostas diferenciadas previamente descritas para estes ensaios (71) (330) (331). Por outro lado, a literatura descreve ainda que nanopartículas com diâmetro molecular inferior a 50 nm (332) ou em alguns casos inferior a 25 nm são mais facilmente/rapidamente internalizadas em células animais, devido ao aumento da permeabilidade e retenção celular, designado por efeito EPR, facto que poderá justificar a atuação mais rápida das nanopartículas com esta dimensão molecular (268). Este tipo de resposta parece ser devido ao facto de a superfície das TiO₂-NP apresentar uma camada de átomos de oxigénio e outra de átomos de titânio que podem alterar a sua carga superficial consoante o pH do meio, exibindo no nosso caso, pH inferior a 5 e carga positiva (270). A polarização da membrana celular devido à diferença de cargas entre o interior e o exterior celular determina que o seu potencial de repouso seja aproximadamente -70 mV. Em geral, proteínas, grupos fosfato e nucleótidos, localizados no interior celular, exibem carga negativa e conseqüentemente atraem para a face externa da membrana citoplasmática materiais, como as TiO₂-NP, com carga positiva (270) (272). A natureza catiónica das nanopartículas de dióxido de titânio nesta situação que facilita a sua adsorção à membrana celular, poderá também ter promovido a sua internalização. Neste processo, as TiO₂-NP podem eventualmente ter criado poros na membrana celular que facilitaram a sua internalização, destruindo o delicado equilíbrio iónico transmembranar, afetando o modo de operar de proteínas e outras macromoléculas protetoras da integridade e funcionamento celular. Alternativamente, alguns investigadores têm revelado que nanopartículas de hidroxiapatite, sílica ou de óxido de ferro, com potencial zeta positivo, exibem capacidade elevada para atravessar a

membrana celular devido a interações electrostáticas que estabelecem com esta que se encontra carregada negativamente. Segundo a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, a estabilidade determinada pelo balanço entre interações de van der Waals e repulsões electrostáticas determina que quando as interações repulsivas superam as interações de van der Waals, as nanopartículas não se agregam, difundindo mais facilmente através da membrana celular, fenómeno que também pode ter ocorrido com as TiO₂-NP <25nm (333). A literatura descreve também que o aumento da temperatura promove a agregação de nanopartículas de ouro em água (334). Embora o choque térmico possa ter aumentado a fluidez membranar, o aumento da capacidade de agregação das nanopartículas <25 nm poderá ter contribuído para obstruir a sua difusão transmembranar, motivo que justifica a menor consistência dos resultados obtidos com nanopartículas de dióxido de titânio <25 nm sujeitas a choque térmico, ainda que grande parte das alterações observadas constituam bons indicadores de reversão do efeito de Crabtree.

Os resultados aqui descritos encorajam o prosseguimento deste estudo no sentido de testar a viabilidade da aplicação clínica de nanopartículas de dióxido de titânio no controlo e prevenção da proliferação celular em animais.

7. Referências bibliográficas

1. Guerrero R, Berlanga M. From the Cell to the Ecosystem: The Physiological Evolution of Symbiosis. *Evol Biol* [Internet]. 2016;43(4):543–52. Available from: ["http://dx.doi.org/10.1007/s11692-015-9360-5"](http://dx.doi.org/10.1007/s11692-015-9360-5)
2. Kozaak BU, Rossum, Van HM, Luttk MAH, Akeroyd M, Benjamin KR, et al. Engineering Acetyl Coenzyme A Supply: Functional Expression of a Bacterial Pyruvate Dehydrogenase Complex in the Cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *MBio*. 2014;5(5):e01696–14.
3. Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2012;76(2):444–95. Available from: <http://mmlbr.asm.org/content/76/2/444.full>
4. Thaxton CB. The mystery of life's origin. Fourth Pri. Lewis and Stanley, editor. Dallas; 1992. p.220 p.
5. Pronk JT, Steensmays HY, Van Dijken JP. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1996;12:1607–33.
6. Bar-Even A, Flamholz A, Noor E, Milo R. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2012;8(6):509–17. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22596202&retmode=ref&cmd=prlinks>
7. van Dijken JP, Scheffers WA. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Lett*. 1986;32(3-4):199–224.
8. Dashko S, Zhou N, Compagno C, Piskur J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res*. 2014;14(6):826–32.
9. Pina C, Santos C, Couto JA, Hogg T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. *Food Microbiol*. 2004;21(4):439–47.
10. Gil J V, Mateo JJ, Jiménez M, Pastor A, Huerta T. Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeasts. *J Food Sci* [Internet]. 1996;61(6):1247–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10971.x>
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10971.x/asset/j.1365-2621.1996.tb10971.x/pdf?v=1&t=ilssdhan&s=fa355c3f4345e00a7f78d4539d5b2758c2fdf561>
11. Orlandi I, Ronzulli R, Casatta N, Vai M. Ethanol and acetate acting as carbon/energy sources negatively affect yeast chronological aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013(802870).
12. Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS*. 2010;14(6):629–38.
13. Gray J V, Petsko G a, Johnston GC, Ringe D, Singer R a, Werner-washburne M. Sleeping Beauty : Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):187–206.
14. Merico A, Sulo P, Piskur J, Compagno C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J*. 2007;274(4):976–89.
15. Rodrigues B, Peinado JM, Raposo S, Constantino A, Quintas C, Lima-Costa ME. Kinetic and energetic parameters of carob wastes fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree effect, ethanol toxicity, and invertase repression. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(6):837–44.
16. Rodrigues-Pousada C, Nevitt T, Menezes R. The yeast stress response: Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *FEBS J*. 2005;272(11):2639–47.
17. Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A. Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2014;13:5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3897899&tool=pmcentrez&>

- endertype=abstract
18. van Urk H, Schipper D, Breedveld GJ, Mak PR, Alexander Scheffers W, van Dijken JP. Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *BBA - Gen Subj.* 1989;992(1):78–86.
 19. Tronchoni J, Gamero A, Arroyo-Lopez FN, Barrio E, Querol A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2009;134(3):237–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004>
 20. Berthels NJ, Cordero Otero RR, Bauer FF, Thevelein JM, Pretorius IS. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(7):683–9.
 21. Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1-2):11–22.
 22. Teusink B, Passarge J, Reijenga C a, Eshalgado E, van der Weijden CC, Schepper M, et al. Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzyme? Testing biochemistry. *Eur J Biochem.* 2000;267:5313–29.
 23. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot.* 2012;2012(ID 217037):1–26.
 24. van Iersel MF, Eppink MH, van Berkel WJ, Rombouts FM, Abee T. Purification and characterization of a novel NADP-dependent branched-chain alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env Microbiol* [Internet]. 1997;63(10):4079–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9327572> \n <http://aem.asm.org/content/63/10/4079.full.pdf>
 25. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry, Seventh Edition.* Freeman WH, editor. 2010. 1120 p.
 26. © Stanford University, Stanford C 94305. *Saccharomyces Genome Database (SGD)* [Internet]. 2016. Available from: <http://www.yeastgenome.org/>
 27. Barnett JA. A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast.* 2003;20(6):509–43.
 28. Dakubo GD. Mitochondrial genetics and cancer. *Mitochondrial Genetics and Cancer.* 2010. 1-356 p.
 29. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309–14.
 30. Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Futur Oncol* [Internet]. 2010;6(1):127. Available from: doi:10.2217/fon.09.145
 31. Natter K, Kohlwein SD. Yeast and cancer cells - Common principles in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2013;1831(2):314–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.003>
 32. Al-Mhanna NMM. Observation of Crabtree effect and diauxic behaviour of yeast by using absorption. *Chem Eng Trans.* 2010;21:1465–70.
 33. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2011;1807(6):568–76.
 34. Smolkova K, Bellance N, Scandurra F, Genot E, Gnaiger E, Plecita-Hlavata L, et al. Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *J Bioenerg Biomembr.* 2010;42(1):55–67.
 35. Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;215:208–17.
 36. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy

- substrate modulates mitochondrial structures and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:985–93.
37. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2011;1807(6):568–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.08.010>
 38. Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2009;1796(2):252–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.003>
 39. Hubbard BP, Sinclair DA. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2014;35(3):146–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>
 40. Dai B-D, Cao Y-Y, Huang S, Xu Y-G, Gao P-H, Wang Y, et al. Baicalein Induces Programmed Cell Death in *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19:803–9.
 41. Howitz K, Bitterman J, Cohen H. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003;425(September):191–6.
 42. Barnett JA, Entian KD. A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005;22(11):835–94.
 43. Meyerhof O. Ueber den Einfluss des Sauerstoffs auf die alkoholische Gaerung der Hefe. *Biochem Z.* 1925;162:43–86.
 44. Swanson WH, Clifton CE. Growth and Assimilation in Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1948;56(1):115–24.
 45. Brauer MJ, Saldanha AJ, Dolinski K, Botstein D. NHomeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2503–17.
 46. DeRisi JL. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* [Internet]. 1997;278(5338):680–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/278/5338/680.abstract>
 47. Goel A, Wortel MT, Molenaar D, Teusink B. Metabolic shifts: A fitness perspective for microbial cell factories. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2012;34(12):2147–60. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3487007/pdf/10529_2012_Article_1038.pdf
 48. Pfeiffer T, Morley A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2014;1(October):17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4429655&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 49. Camara AKS, Lesnefsky EJ, Stowe DF. Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(3):280–326.
 50. Wartier DC, Muravchick S, Levy RJ, Muravchick S, Richard J, Levy. Clinical Implications of Mitochondrial Dysfunction. *Anesthesiology.* 2006;105(4):819–37.
 51. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2014;39(8):347–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>
 52. Horecker BL. The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(50):47965–71.
 53. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;53(3):421–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006>
 54. Kruger NJ, Von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol.* 2003;6(3):236–46.
 55. Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, et al. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells

- through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett.* 1999;456:113–8.
56. Boros LG, Brandes JL, Yusuf FI, Cascante M, Williams RD, Schirmer WJ. Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: A possible mechanism of antitumor action. *Med Hypotheses.* 1998;50(6):501–6.
 57. Boros LG, Lee PWN, Brandes JL, Cascante M, Muscarella P, Schirmer WJ, et al. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: Is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med Hypotheses.* 1998;50(1):55–9.
 58. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression ☆. *BBA - Mol Cell Res* [Internet]. 2013;1833(12):3481–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>
 59. Anastasiou D. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive Oxygen Species contributes to cellular Antioxydant responses. *Science.* 2011;334(December):1278–83.
 60. Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2000;64(1):34–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101808> \n <http://mmbbr.asm.org/content/64/1/34.s hort>
 61. Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2001;22(4-5):217–46. Available from: 10.1016/S0098-2997(01)00012-7
 62. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [Internet]. 1998;14(16):1511–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885153>
 63. Verdoucq L, Vignols F, Jacquot JP, Chartier Y, Meyer Y. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem.* 1999;274(28):19714–22.
 64. Grzelak A, Macierzynska E, Bartosz G. Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Gerontol.* 2006;41(9):813–8.
 65. Butylina S, Shataeva L, Nystrom M. Separation of nucleoprotein complexes with antioxidant activity from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sep Purif Technol.* 2007;53(1):64–70.
 66. Siegal ML. Shifting Sugars and Shifting Paradigms. *PLoS Biol.* 2015;13(2):e1002068.
 67. Hoek PIMV a N, Dijken JPV a N, Pronk JT. Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker ' s Yeast. *Society* [Internet]. 1998;64(11):4226–33. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/64/11/4226>
 68. Longo VD, Liou LL, Valentine JS, Gralla EB. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys.* 1999;365(1):131–42.
 69. Gray J V, Petsko G a, Johnston GC, Ringe D, Singer R a, Werner-washburne M. Sleeping Beauty : Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* “. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):187–206.
 70. Werner-washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1993;57(2):383–401.
 71. Madigan M, Martinko J, Parker J. *Microbiologia de Brook.* 10nd Ed. Pearson Prentice Hall, editor. São Paulo, Brasil.; 2004.
 72. Rettori D, Volpe P. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. *Quim Nova.* 1999;2:23.
 73. Hauptmann P, Riel C, Kunz-Schughart LA, Fröhlich KU, Madeo F, Lehle L. Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol Microbiol.* 2006;59(3):765–78.
 74. Laun P, Heeren G, Rinnerthaler M, Rid R, Kössler S, Koller L, et al. Senescence and apoptosis in yeast mother cell-specific aging and in higher cells: A short review. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2008;1783(7):1328–34.
 75. Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2003;371(1):89–95.
 76. Jazwinski SM. Yeast longevity and aging - The mitochondrial connection. *Mech Ageing*

- Dev. 2005;126(2):243–8.
77. Sinclair DA. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(8):857–67.
 78. Swinnen E, Wanke V, Roosen J, Smets B, Dubouloz F, Pedruzzi I, et al. Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Div.* 2006;1(3):8.
 79. Adams a, Pringle J. Relationship of actin and tubulin distribution in wild-type and morphogenetic mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1984;98(March):934–45.
 80. Jakubowski W, Biliński T, Bartosz G. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000;28(5):659–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754260>
 81. Šťovíček V, Váchová L, Palková Z. Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2012;5(2):203–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 82. Pinto I, Cardoso H, Leão C, van Uden N. High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol Bioeng.* 1989;33(10):1350–2.
 83. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M, Painter P. *General microbiology*. Macmillan. 5ª edição. Macmillan, editor. London; 1986.
 84. Gasch a P, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(12):4241–57.
 85. Sugiyama K, Kawamura A, Izawa S, Inoue Y. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 2000;352:71–8.
 86. Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(May):5116–21.
 87. Benov L, Coli F. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995;177:3344–6.
 88. Boles E, Jong-gubbels P De, Pronk JT. Identification and Characterization of MAE1 , the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme Identification and Characterization of MAE1 , the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. 1998;180(11):2875–82.
 89. Hildyard JCW, Halestrap AP. Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 2003;374(Pt 3):607–11.
 90. Boles E, Hollenberg CP, Heinisch JJ, Schulte F, Miosga T, Freidel K, et al. Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to Characterization of a Glucose-Repressed Pyruvate Kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* That Is Catalytically to Fructos. 1997;179(9):2–9.
 91. Reibstein D, den Hollander J a, Pilkis SJ, Shulman RG. Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochemistry* [Internet]. 1986;25(1):219–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2937446>
 92. Krause-Buchholz U, Gey U, Wünschmann J, Becker S, Rödel G. YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* 2006;580(11):2553–60.
 93. Rigoulet M, Aguilaniu H, Avéret N, Bunoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X, et al. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 2004;256-257(1-2):73–81.
 94. Pippert P. The yeast heat shock response. Chapman an. edited by S. Hohmann and WEM, editor. New York.; 1997. 75-99 p.

95. Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D, Butow RA. Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*. 1999;15(13):1377–91.
96. Eraso P, Gancedo JM. Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP. *Eur J Biochem*. 1984;141:195–8.
97. Pérez-Vázquez V, Saavedra-Molina A, Uribe S. In *Saccharomyces cerevisiae*, Cations Control the Fate of the Energy Derived from Oxidative Metabolism Through the Opening and Closing of the Yeast Mitochondrial Unselective Channel. *J Bioenerg Biomembr*. 2003;35(3):231–41.
98. Arlia-Ciommo A, Leonov A, Piano A, Svistkova V, Titorenko VI. Cell-autonomous mechanisms of chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*. 2014;1(6):163–78.
99. Capp M, Stepanek L, Harant K, Vachova L, Palkova Z. Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Mol Cell*. 2012;46(4):436–48.
100. Váchová L, Chernyavskiy O, Strachotová D, Bianchini P, Burdíkova Z, Ferčíková I, et al. Architecture of developing multicellular yeast colony: Spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ Microbiol*. 2009;11(7):1866–77.
101. Váchová L, Palková Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol*. 2005;169(5):711–7.
102. Cap M, Vachov L, Palkova, Zdena. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32572–81.
103. Mináriková L, Kuthan M, Ricicová M, Forstová J, Palková Z. Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res [Internet]*. 2001;271(2):296–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716542>
104. Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK. Recent Developments in Yeast Aging. 2007;3(5).
105. Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK. Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet*. 2007;3(5):655–60.
106. Wissing S, Ludovico P, Herker E, Buttner S, Engelhardt SM, Decker T, et al. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 2004;166(7):969–74.
107. Ligr M, Madeo F, Frohlich E, Hilt W, Frohlich KU, Wolf DH. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett*. 1998;438(1-2):61–5.
108. Carrasco P, Querol A, del Olmo M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol*. 2001;175:450–7.
109. Bauer EF, Pretorius LS. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. *South African J Enol Vitic*. 2000;21(Special Issue):27–51.
110. Capela-Pires J, Ferreira R, Alves-Pereira I. Heat shock and titanium dioxide nanoparticles decrease superoxide dismutase and glutathione enzymes activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Green Process Synth [Internet]*. 2015;4(3). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/gps.2015.4.issue-3/gps-2015-0007/gps-2015-0007.xml>
111. Rosado T, Conim A, Alves-Pereira I, Ferreira R. Vanadium pentoxide effects on stress responses in wine *Saccharomyces cerevisiae* strain UE-ME3. *Ecotoxicology*. 2009;18(8):1116–22.
112. Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH, Harder W. Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast [Internet]*. 1987;3(2):77–84. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.320030204/epdf>
113. Albers E, Larsson C, Lidén G, Niklasson C, Gustafsson L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl Environ Microbiol [Internet]*. 1996;62(9):3187–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
114. Bruinenberg PM, Van Dijken JP, Scheffers W a. A Theoretical Analysis of NADPH

- Production and Consumption in Yeasts. *Microbiology*. 1983;129(4):953–64.
115. Guiard B. Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2). *EMBO J* [Internet]. 1985;4(12):3265–72. Available from: <http://research.bmn.com/medline/search/results?uid=MDLN.86135959>
 116. Bakker BM, Overkamp KM, Van Maris AJA, Kötter P, Luttik MAH, Van Dijken JP, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2001;25(1):15–37.
 117. Ciriacy M. Alcohol dehydrogenases. In: *Yeast Sugar Metabolism*. (Zimmermann, F.K. and Entian, K.D., Eds.), 213–223. Technomic, Lancaster, PA. 1997.
 118. Nissen TL, Schulze U, Nielsen J, Villadsen J. Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 1997;143(May):203–18.
 119. de Vries S, Marres C a. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1987;895(3):205–39.
 120. Ohnishi T, Kawaguchi K, Hagihara B. Preparation and Some Properties of Yeast Mitochondria. *J Biol Chem*. 1966;241(8):1797–806.
 121. Pålman IL, Larsson C, Averet N, Buiioust O, Boubekour S, Gustafsson L, et al. Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27991–5.
 122. Dawson AG. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 1979;4(8):171–6.
 123. Nosek J, Fukuhara H. mitochondrial DNA of yeasts . NADH Dehydrogenase Subunit Genes in the Mitochondrial DNA of Yeasts. 1994;176(18):5622–30.
 124. Vanlerberghe GC, McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997;48(1):703–34.
 125. Møller IM, Rasmusson AG, Fredlund KM. NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 1993;25(4):377–84.
 126. Nalini P, Ellaiah P, Prabhakar T, Girijasankar G. Microbial alkaline phosphatases in bioprocessing. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015;4(3):384–96.
 127. Pandey SK, Banik RM. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresour Technol*. 2011;102(5):4226–31.
 128. Pantazaki A, Karagiorgas A, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis D. Hyperalkaline and thermostable phosphatase in *Thermus thermophilus*. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 1999;75(2-3):249–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10230023>
 129. Anderson R a, Bosron WF, Kennedy FS, Vallee BL. Role of magnesium in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(8):2989–93.
 130. Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Crit Rev Microbiol*. 1982;10(4):317–91.
 131. Taylor JS, Coleman JE. Nitrogen ligands at the active site of alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(4):859–62.
 132. Fernandes J, Amorim R, Azevedo I, Martins MJ. In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium. *Brazilian J Med Biol Res*. 2008;41(1):41–6.
 133. Tuleva B, Vasileva-tonkova E, Galabova D. A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* with protein phosphatase activity. 1998;161:1–6.
 134. Nishimura K, Yasumura K, Igarashi K, Harashima S, Kakinuma Y. Transcription of some PHO genes in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Spt7p. *Yeast*. 1999;15(16):1711–7.

135. Spasova D, Galabova D. Yeast Permeabilization as a Tool for Measurement of in situ Enzyme Activity : Localization of Alkaline Phosphatase. 1998;347–51.
136. McLachlan AD. Gene duplication in the evolution of the yeast hexokinase active site. *Eur J Biochem.* 1979;100(1):181–7.
137. Anderson CM, Stenkamp RE, Steitz TA. Sequencing a protein by X-ray crystallography. *J Mol Biol.* 1978;123(1):15–33.
138. Steitz T a, Shoham M, Bennett WS. Structural dynamics of yeast hexokinase during catalysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1981;293(1063):43–52.
139. Gao H, Leary JA. Multiplex inhibitor screening and kinetic constant determinations for yeast hexokinase using mass spectrometry based assays. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(3):173–81.
140. Davies DD. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise Volume 2: Metabolism and Respiration.* Elsevier, editor. 1980.
141. Morgan HP, Zhong W, McNae IW, Michels PAM, Fothergill-Gilmore LA, Walkinshaw MD. Structures of pyruvate kinases display evolutionarily divergent allosteric strategies. *R Soc open Sci* [Internet]. 2014;1(1):140120. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4448766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064527>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4448766>
142. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(7):969–80.
143. Suzuki K, Ito S, Shimizu-Ibuka A, Sakai H. Crystal structure of pyruvate kinase from *Geobacillus stearothermophilus*. *J Biochem.* 2008;144(3):305–12.
144. Nishizawa M, Araki R, Teranishi Y. Identification of an upstream activating sequence and an upstream repressible sequence of the pyruvate kinase gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1989;9(2):442–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=362619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
145. Boles E, Heinisch J, Zimmermann FK. Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1993;9(7):761–70.
146. König S. Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* 1998;1385(2):271–86.
147. Ter Schure EG, Sillje HHW, Vermeulen EE, Kalthorn JW, Verkleij AJ, Boonstra J, et al. Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 1998;144(5):1451–62.
148. Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast.* 1996;12(3):247–57.
149. Schmitt HD, Zimmermann FK. Genetic Analysis of the Pyruvate Decarboxylase Reaction in Yeast Glycolysis. 1982;151(3):1146–52.
150. Bert Vallee, Hoch F. Proceedings of the national academy of sciences. In: Zinc, a component of yeast alcohol dehydrogenase. 1955. p. 328–38.
151. Larroy C, Parés X, Biosca JA. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *Eur J Biochem.* 2002;269(22):5738–45.
152. Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002;28(1):276–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11752314
153. Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev I V, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, et al. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001;29(1):22–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=29819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- dertype=abstract
154. De Smidt O, Du Preez JC, Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Res.* 2008;8(7):967–78.
 155. Bioinformatics SSI of. ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal [Internet]. 2016. Available from: <http://www.expasy.org/>
 156. Morton RK, Shepley K. The preparation of crystalline forms of ferricytochrome b2 and ferrocytochrome b2. *Biochem J.* 1963;89(257).
 157. Brambilla L, Bolzani D, Compagno C, Carrera V, Van Dijken JP, Pronk JT, et al. NADH reoxidation does not control glycolytic flux during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to glucose excess. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;171(2):133–40.
 158. Van Dijken JP, Van Den Bosch E, Hermans JJ, De Miranda LR, Scheffers WA. Alcoholic fermentation by “non-fermentative” yeasts. *Yeast* [Internet]. 1986;2(2):123–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/yea.320020208>
 159. Kresze G-B, Ronft H. Pyruvate Dehydrogenase Complex from Baker’s Yeast. *Eur J Biochem* [Internet]. 1981;119(3):573–9. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05646.x/epdf>
 160. Liao XS, Small WC, Sreere PA, Butow RA. Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1991;11(1):38–46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=359583{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=abstract>
 161. Graybill ER, Rouhier MF, Kirby CE, Hawes JW. Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 2007;465(1):26–37.
 162. Chapman KB, Solomon SD, Boeke JD. SDH1, the gene encoding the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1992;118(1):131–6.
 163. Stryer L. *Biochemistry*. Co WHF&, editor. New York; 2004.
 164. Overkamp KM, Bakker BM, Kötter P, Tuijl V, Vries S De, Dijken JP Van, et al. In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. 2000;182(10):2823–30.
 165. Luttik MAH, Overkamp KM, Kötter P, De Vries S, Van Dijken JP, Pronk JT. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem.* 1998;273(38):24529–34.
 166. Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform.* 2011;12(5):449–62.
 167. Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1217–35.
 168. Park JS, Li Y fen, Bai Y. Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber’s hereditary optic neuropathy mutation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2007;1772(5):533–42.
 169. Velázquez I, Pardo JP. Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 2001;389(1):7–14.
 170. Small WC, McAlister-henn L, Alister-henn LEEMC. Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. 1998;180(16):4051–5.
 171. Minard KI, McAlister-Henn L. Glucose-induced degradation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in yeast. *J Biol Chem.* 1992;267(24):17458–64.
 172. Sutherland P, McAlister-Henn L. Isolation and expression of the *Escherichia coli* gene

- encoding malate dehydrogenase. *J Bacteriol* [Internet]. 1985;163(11):1074–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2993232
173. Boles E, De Jong-Gubbels P, Pronk JT. Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J Bacteriol*. 1998;180(11):2875–82.
 174. Viljoen M, Subden R, Krizus A, Vuuren H Van. Molecular analysis of the malic enzyme gene (*mae2*) of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* [Internet]. 1994;10:613–24. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.320100506/abstract>
 175. Thompson LM, McAlister-Henn L. Dispensable presequence for cellular localization and function of mitochondrial malate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1989;264(20):12091–6.
 176. Thompson LM, Sutherland P, Steffan JS, McAlister-Henn L. Gene sequence and primary structure of mitochondrial malate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 1988;27(22):8393–400.
 177. Gibson N, McAlister-Henn L. Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25628–36.
 178. Minard KI, McAlister-Henn L. Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1991;11(1):370–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=359635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 179. Winzeler EA. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* (80) [Internet]. 1999;285(5429):901–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5429.901>
 180. Entian K-DK, Vogel RFR, Rose M, Hofmann L, Mecke D. Isolation and primary structure of the gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* [Internet]. 1988;236(1):195–200. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80313-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(88)80313-2)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014579388803132>
 181. McAlister-Henn L, Steffan JS, Minard KI, Anderson SL. Expression and function of a mislocalized form of peroxisomal malate dehydrogenase (MDH3) in yeast. *J Biol Chem*. 1995;270(36):21220–5.
 182. Steffan JS, McAlister-Henn L. Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J Biol Chem* [Internet]. 1992;267(34):24708–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1447211
 183. van Roermund CW, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJ, Tabak HF. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J* [Internet]. 1995;14(14):3480–6. Available from: </pmc/articles/PMC394415/?report=abstract>
 184. Holzer H. Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem Sci*. 1976;1(8):178–81.
 185. Sreere PA. No Title. *Curr Top Cell Regul*. 1972;5(229-283).
 186. Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*. 1978;47:533–606.
 187. Maaheimo H, Fiaux J, Cakar P, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids. *Eur J Biochem / FEBSr*. 2001;268(January):2464–79.
 188. Fiaux J, Fiaux J, Sonderegger M, Sonderegger M, Wu K, Wu K, et al. Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts. *Society*. 2003;2(1):170–80.
 189. Szyperski T. Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J*

- Biochem. 1995;232(2):433–48.
190. Page RA, Okada S, Harwood JL. Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1994;1210(3):369–72.
191. Kang F, Ridout C, Morgan C, Rawsthorne S. The activity of acetyl-CoA carboxylase is not correlated with the rate of lipid synthesis during development of oilseed rape (*Brassica napus* L.) embryos. *Planta* [Internet]. 1994;193(3):320–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00201808>
192. Roesler K, Shintani D, Savage L, Boddupalli S, Ohlrogge J. Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiol.* 1997;113(1):75–81.
193. Boulton C, Ratledge C. Correlation of Lipid Accumulation in Yeasts with Possession of ATP: Citrate Lyase. *Microbiology.* 1981;127(1):169–76.
194. Wynn JP, Ratledge C. Malic enzyme is a major source of NADPH for lipid accumulation by *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 1997;143(1):253–7.
195. Kamisaka Y, Yokochi T, Nakahara T, Suzuki O. Characterization of the diacylglycerol acyltransferase activity in the membrane fraction from a fungus. *Lipids.* 1993;28(7):583–7.
196. Wynn J, Hamid A, Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology* [Internet]. 1999;145(8):1911–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463157>
197. Nogue I, Johnston M. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene.* 1990;96(2):161–9.
198. Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1995;368(1):73–6.
199. Outten CE, Culotta VC. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2003;22(9):2015–24.
200. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012;190(4):1157–95.
201. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* [Internet]. 2009;417(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061483> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2605959>
202. Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A. The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(1):35–64.
203. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312–22.
204. Sohal R, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science.* 1996;273:59–63.
205. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol Cell* [Internet]. 2007;26(1):1–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507001864>
206. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007;173(3):502–11.
207. Brechtlová M, Kura L, Zálešáková J, J Č, Líška B. Effect of Mineral Water from Trenčianske Teplice (Drinkable Source , Drill SB-3) on Lipid Peroxidation in Vitro. 2010;111(4):257–62.
208. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2381–6.
209. Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem.* 2001;222(1-2):183–8.

210. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313.
211. Gilmore WJ, Kirby GM. Endoplasmic reticulum stress due to altered cellular redox status positively regulates murine hepatic CYP2A5 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(2):600–8.
212. McConkey D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998;99:157–68.
213. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Darnell J. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Darnell, J., (1995) *Molecular Cell Biology*, 3ªEd, Scientific American Books, New York. 3ªEd ed. Scientific American Books NY, editor. New York.; 1995.
214. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis. Vol. 68, *International Review of Cytology.* 1980. 251-306 p.
215. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14(3):131–6.
216. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239–47.
217. Mesecke N, Spang A, Deponte M, Herrmann J. A Novel Group of Glutaredoxins in the cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Mol Biol Cell.* 2008;19:2673–80.
218. Espindola ADS, Gomes DS, Panek AD, Eleutherio ECA. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology.* 2003;47(3):236–41.
219. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(7):933–56.
220. Scrutton NS, Berry a, Perham RN. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature.* 1990;343(6253):38–43.
221. Creissen G, Reynolds H, Xue Yongbiao, Mullineaux P. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplast and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* 1995;8(2):167–75.
222. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 2012;4(6):1247–53.
223. Mehta JP, Bhatt PN, Misra SN. An absorption spectral study of Nd (III) with glutathione (reduced), GSH in aqueous and aquated organic solvent in presence and absence of Zn (II). *J Solid State Chem.* 2003;171(1-2):175–82.
224. Barreiros AL, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113–23.
225. Grabowska D, Chelstowska A. The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J Biol Chem.* 2003;278(16):13984–8.
226. Skoneczny M, Rytka J. Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochem J.* 2000;350:313–9.
227. Liu X., Elashvili I, Gralla E., Valentine J., Lapinskas P, Culotta V., et al. Yeast Lacking Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*, 267. 1992;267:18298–302.
228. Tanaka A, Ueda M. Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycol Res [Internet].* 1993;97(9):1025–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80504-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80504-2)
229. Horiguchi H, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y. Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Biol Chem.* 2001;276(17):14279–88.
230. Cornish-Bowden A, Cárdenas ML. Information transfer in metabolic pathways. *Eur J Biochem [Internet].* 2001;268(24):6616–24. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0014-2956.2001.02616.x/full>
231. Low PS, Bada JL, Somero GN. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free

- energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(2):430–2.
232. Laidler KJ. The Development of the Arrhenius Equation. 1984;volume 61(6).
233. Fox C, Keith A. Membrane assembly. eds Sinaue. Fox, C., Keith, A. (1972) Membrane assembly, in: Membrane molecular biology, eds Sinauer. 1972.
234. Talsky G. The anomalous temperature dependence of enzyme-catalyzed reactions. *Angew Chem Int Ed [Internet]*. 1971;10(8):548–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4999054>
235. Eyring H. The Activated Complex in Chemical Reactions. 1935;107.
236. Woo JM, Yang KM, Kim SU, Blank LM, Park JB. High temperature stimulates acetic acid accumulation and enhances the growth inhibition and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* under fermenting conditions. *Appl Microbiol Biotechnol [Internet]*. 2014;98(13):6085–94. Available from: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84903594945&partnerID=40&md5=f5ae71494b3aca63728c35796fab87ffnhttp://download.springer.com/static/pdf/551/art%3A10.1007%2Fs00253-014-5691-x.pdf?auth66=1413274248_9fe4ce91dc5c50cb4b39fe2d315769f8&ext=
237. Postmus J, Tuzun I, Bekker M, Müller WH, de Mattos MJT, Brul S, et al. Dynamic regulation of mitochondrial respiratory chain efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology [Internet]*. 2011;157(Pt 12):3500–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964735>
238. Pinto I, Cardoso, H., Leao C, van Uden N. High Enthalpy and Low Enthalpy Death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by Acetic Acid. *Biotechnol Bioeng.* 1989;33:1350.
239. Yang KM, Lee NR, Woo JM, Choi W, Zimmermann M, Blank LM, et al. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res [Internet]*. 2012;12(6):675–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697060>
240. Yang KM, Woo JM, Lee SM, Park JB. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpressing an ATP-binding cassette efflux pump. *Chem Eng Sci [Internet]*. 2013;103:74–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2012.09.015>
241. Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2008;7(5):783–90.
242. Pires JMC. Influência da temperatura na proliferação de *Saccharomyces cerevisiae* em presença de nanopartículas de dióxido de titânio (dissertação de mestrado). Universidade de Évora; 2011.
243. ISO/TR27628:2007. Workplace atmospheres -- Ultrafine, nanoparticle and nanostructured aerosols -- Inhalation exposure characterization and assessment. 2007.
244. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*. 2007;150(1):5–22.
245. Kim M-S, Louis KM, Pedersen J a, Hamers RJ, Peterson RE, Heideman W. Using citrate-functionalized TiO₂ nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity. *Analyst [Internet]*. 2014;139(5):964–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384696>
246. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology [Internet]*. 2014;12(1):5. Available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/12/1/5>
247. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: Health effects - Pros and cons. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1818–25.
248. Kaluza, S., Balderhaar J., Orthen, B., Jankowska, E., Pietrowski, P., Rosell M, Tanarro, C., Tejedor J., Zugasti A. Workplace exposure to nanoparticles. Joanna Kosk-Bienko, editor. European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA); 2009.
249. Curtis, Greenberg, Kester, P S, G. K. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol Rev*. 2006;125:245–60.

250. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823–39.
251. Kaluza S, Schröter MK, D'Alnoncourt RN, Reinecke T, Muhler M. High surface area ZnO nanoparticles via a novel continuous precipitation route. *Adv Funct Mater.* 2008;18(22):3670–7.
252. Andreev YG, Panchmatia PM, Liu Z, Parker SC, Islam MS, Bruce PG. The Shape of TiO₂ -B Nanoparticles. *J Am Chem Soc [Internet].* 2014;136(17):6306–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25090087>\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712726\nhttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja412387c
253. Dinadayalane TC, Leszczynski J. Remarkable diversity of carbon-carbon bonds: Structures and properties of fullerenes, carbon nanotubes, and graphene. *Struct Chem.* 2010;21(6):1155–69.
254. Maier J. Nanoionics: ion transport and electrochemical storage in confined systems. *Nat Mater.* 2005;4(11):805–15.
255. Magrez A, Kasas S, Pasquier N. Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials.
256. Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology.* 2007;230(1):90–104.
257. Hoshino Y, Ohashi RC, Miura Y. Rational design of synthetic nanoparticles with a large reversible shift of acid dissociation constants: Proton imprinting in stimuli responsive nanogel particles. *Adv Mater.* 2014;26(22):3718–23.
258. Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 2007;171(3):99–110.
259. Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect.* 2004;112(10):1058–62.
260. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol [Internet].* 2008;3(3):145–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654486>
261. Braga NA, Baldan MR, Ferreira NG, Neto FP. Aspectos Relacionados À Obtenção E À Caracterização De Titânio. 2008;119–24.
262. Kononen M, Kivilahti J. Fusing of dental ceramics to titanium. *J Dent Res.* 2001;80(3):848–54.
263. Ze X, Su M, Zhao X, Jiang H, Hong J, Yu X, et al. TiO₂ Nanoparticle-Induced Neurotoxicity May Be Involved in Dysfunction of Glutamate Metabolism and Its Receptor Expression in Mice. 2014;655–62.
264. Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess [Internet].* 2008;25(7):795–821. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-46349107675&partnerID=40&md5=3813593d935ffe74ebed1b633a10d136>\nhttp://pdfserve.informaworld.com/173883_731468893_793610806.pdf
265. Roco MC. International strategy for nanotechnology research and development. *J Nanoparticle Res.* 2001;3(5-6):353–60.
266. Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect.* 2002;110(8):797–800.
267. Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol.* 1998;18(5):307–12.
268. Malato S, Fernández-Ibáñez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catal Today.* 2009;147(1):1–59.

269. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14(1):1–16.
270. Duan X, Li Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small.* 2013;9(9-10):1521–32.
271. Kasemets K, Ivask A, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2009;23(6):1116–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>
272. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010;6(1):12–21.
273. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* [Internet]. 2009;8(7):543–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2442>
274. Mortimer M, Kasemets K, Vodovnik M, Marinsek-Logar R, Kahru A. Exposure to CuO nanoparticles changes the fatty acid composition of protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2011;45(15):6617–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/es201524q>
275. Moore VC, Strano MS, Haroz EH, Hauge RH, Smalley RE, Schmidt J, et al. Individually wususpended wingle-walled carbon nanotubes in various surfactants. *Nano Lett* [Internet]. 2003;3(10):1379–82. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl034524j>
<http://dx.doi.org/10.1021/nl034524j>
276. Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Hong SH, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis through the JNK/p38-caspase-8-Bid pathway in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;386(4):682–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.097>
277. Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008;180(3):222–9.
278. Pires JMC. Nanopartículas de dióxido de titânio: pró-oxidante indutor de morte celular em *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3. Universidade de Évora; 2009.
279. Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol.* 2007;84(4):415–30.
280. Lovern SB, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem.* 2006;25(4):1132–7.
281. Lake B. Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. Press I, editor. Oxford; 1987. 183–215 p.
282. Sugimoto Y, Ohta Y, Morikawa T, Yamashita T, Yoshida M, Tamaoki B. In vitro metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*). *J Steroid Biochem.* 1990;35(2):271–9.
283. Tzagoloff A. Bioenergetics: mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis Assembly of the Mitochondrial Membrane System. *J Biol Chem.* 1971;246(9):3050–8.
284. Lowry O.H., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
285. Cooper S. Bacterial Growth and Division. *Encycl Mol Cell Biol Mol Med* [Internet]. 2006;16 v. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600906.mcb.200300079>
286. Pelczar, Krieg. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. McGraw-Hil. New York.; 1993.
287. Bretaudiere, J, T. S. No Title. In: Verlag Chemie F, editor. *Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol II.*, 3rd. ed. florida; 1984.
288. Dell' Antone P. Energy metabolism in cancer cells: How to explain the Warburg and Crabtree effects? *Med Hypotheses.* 2012;79(3):388–92.
289. Bergmeyer, Bergmeyer, Grassl. *Methods of enzymatic analyses*. Weinheim: . 1983.
290. Maitra PK, Lobo Z. Control mechanisms and biochemical genetics : A Kinetic Study of Glycolytic Enzyme Synthesis in Yeast of Glycolytic Synthesis in Yeast. *J Biol Chem.*

- 1971;246:475–88.
291. Reid MF, Fewson C a. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 1994;20(1):13–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8185833>
 292. Sjöberg BM, Karlsson M, Jörnvall H. Half-site reactivity of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9736–43.
 293. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(2):468–77.
 294. Kim K-S, Rosenkrantz MS, Guarente L. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol*. 1986;6(6):1936–42.
 295. Walzel B, Speer O, Boehm E, Kristiansen S, Chan S, Clarke K, et al. New creatine transporter assay and identification of distinct creatine transporter isoforms in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(2):E390–401.
 296. Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, T. M, Silva, Barrientos A, et al. Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2002;13:2598–606.
 297. Saliola M, Tramonti A, Lanini C, Cialfi S, De Biase D, Falcone C. Intracellular NADPH levels affect the oligomeric state of the glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Eukaryot Cell*. 2012;11(12):1503–11.
 298. Kim IS, Kim YS, Yoon HS. Glutathione reductase from *Oryza sativa* increases acquired tolerance to abiotic stresses in a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22(11):1557–67.
 299. Goldberg Spooner. *Methods of enzymatic analysis*,. In: VCH NY, editor. 3rd ed. 1987. p. 258–65.
 300. Flohé, Günzler. Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods Enzymol. Methods Enzym*. 1984;115:114–21.
 301. Oberley L, Spitz D. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzym*. 1984;105.:457.
 302. Beers S. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*. 1952;195:133–40.
 303. Liu J, Zhang Y, Huang D, Song G. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*. 2005;280(1-2):139–45.
 304. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214–26.
 305. Carru C, Zinellu A, Sotgia S, Marongiu G, Farina MG, Usai MF, et al. Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2003;1017(1-2):233–8.
 306. Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, et al. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int J Food Microbiol*. 2008;121(1):84–91.
 307. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227–31.
 308. Turton HE, Dawes IW, Grant CM. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol*. 1997;179(4):1096–101.
 309. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–8.
 310. Sokal RR, Rohlf FJ. *New York*. 2nd, editor. New York: DOVER PUBLICATIONS; 2009. 190 p.
 311. Carvalho M. *A estatística aplicada à experimentação agrícola*. Nova agric. porto; 1988.
 312. Siegel A, Morgan C. *Statistic and data analysis - an introduction*. 2nd ed. Sons john wiley and, editor. New York; 1996.

313. Gomez K, Gomez A. Statistical procedures for agricultural research. 2nd ed. John Wiley and Sons, editor. New York; 1984.
314. Frick O, Wittmann C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb Cell Fact*. 2005;4:30.
315. Munna MS, Humayun S, Noor R. Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. *BMC Res Notes* [Internet]. 2015;8:369. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4546815&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
316. Chen, Wang, Zhuo, Chen, Zhao, Luan, et al. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the cardiovascular system after oral administration. *Toxicol Lett* [Internet]. 2015;239(2):123–30. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L606163370> \n <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.013> \n <http://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE&iissn=18793169&id=doi:10.1016/j.toxlet.2015.09.013&atitle=Effect+of+titanium+dioxid>
317. Bianconi ML. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *J Biol Chem*. 2003;278(21):18709–13.
318. Walsh RB, Kawasaki G, Fraenkel DG. Cloning of genes that complement yeast hexokinase and glucokinase mutants. *J Bacteriol*. 1983;154(2):1002–4.
319. Papini M, Nookaew I, Uhlén M, Nielsen J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2012;11(1):136. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/136>
320. Naviaux RK. Oxidative shielding or oxidative stress? *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2012;342(3):608–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700427>
321. Guppy M, Greiner E, Brand K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem*. 1993;212:95–9.
322. Boles E, Jong-gubbels P De, Pronk JT. Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. 1998;180(11):2875–82.
323. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol*. 1999;276(5 Pt 1):C1121–31.
324. Tahara EB, Barros MH, Oliveira G a, Netto LES, Kowaltowski AJ. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J*. 2007;21(1):274–83.
325. Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L, Nielsen J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007;104(7):2402–7. Available from: <http://www.pnas.org/content/104/7/2402.long>
326. Gomes DS, Pereira MD, Panek AD, Andrade LR, Eleutherio ECA. Apoptosis as a mechanism for removal of mutated cells of *Saccharomyces cerevisiae*: The role of Grx2 under cadmium exposure. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2008;1780(2):160–6.
327. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*. 2009;32(1):169–74.
328. Olayanju B, Hampsey JJ, Hampsey M. Genetic analysis of the Warburg effect in yeast. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2015;57:185–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.009>
329. Pelling AE. Local Nanomechanical Motion of the Cell Wall of *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Science* (80) [Internet]. 2004;305(5687):1147–50. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1097640>
330. Fleischer a, O'Neill M, Ehwald R. The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol* [Internet]. 1999;121(3):829–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=59445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
331. Fujino T, Itoh T. Changes in Pectin Structure during Epidermal Cell Elongation in Pea (*Pisum sativum*) and Its Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Cell Physiol* [Internet]. 1998;39(12):1315–23. Available from: <http://pcp.oxfordjournals.org/content/39/12/1315.abstract> \n <http://pcp.oxfordjournals.org/content/39/12/1315.short>
332. Al-Awady MJ, Greenway GM, Paunov VN. Nanotoxicity of polyelectrolyte-functionalized titania nanoparticles towards microalgae and yeast: role of the particle concentration, size and surface charge. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(46):37044–59. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05577F>
333. Ohshima, H. The Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory of colloid stability. In: *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces*; John Wiley. 2012. p. 27–37.
334. Zyuzin M V., Honold T, Carregal-Romero S, Kantner K, Karg M, Parak WJ. Influence of Temperature on the Colloidal Stability of Polymer-Coated Gold Nanoparticles in Cell Culture Media. *Small*. 2016;12(13):1723–31.

8. Anexos

Quadro A1 Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros analisados de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YPG, YPGD, YPGD na ausência de TiO₂-NP e na presença de TiO₂-NP <25 nm ou TiO₂-NP <100 nm, em condições de choque térmico ou não, durante 100 ou 200 min.

Conc. ou activ. enzimática	Origem de variância	Somados quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
viabilidade	Entre grupos	1395,296	11	126,845	70,305	,000
	No interior dos grupos	86,602	48	1,804		
	Total	1481,898	59			
taxa específica de crescimento	Entre grupos	,166	11	,015	10,305	,000
	No interior dos grupos	,070	48	,001		
	Total	,236	59			
ALP	Entre grupos	2109,331	11	191,757	12,955	,000
	No interior dos grupos	710,476	48	14,802		
	Total	2819,807	59			
HXK	Entre grupos	1098,510	11	99,865	22,353	,000
	No interior dos grupos	214,444	48	4,468		
	Total	1312,954	59			
PYK	Entre grupos	126,812	11	11,528	17,177	,000
	No interior dos grupos	32,214	48	,671		
	Total	159,026	59			
PDC	Entre grupos	1078,769	11	98,070	9,533	,000
	No interior dos grupos	493,783	48	10,287		
	Total	1572,552	59			
ADH	Entre grupos	4013,313	11	364,847	17,921	,000
	No interior dos grupos	977,198	48	20,358		
	Total	4990,511	59			
DLD	Entre grupos	280,646	11	25,513	17,919	,000
	No interior dos grupos	68,342	48	1,424		
	Total	348,989	59			
CS	Entre grupos	221953,930	11	20177,630	540,926	,000
	No interior dos grupos	1790,497	48	37,302		
	Total	223744,427	59			
SDH	Entre grupos	39136,679	11	3557,880	277,125	,000
	No interior dos grupos	616,249	48	12,839		
	Total	39752,928	59			
NDE1	Entre grupos	9604,924	11	873,175	6,645	,000
	No interior dos grupos	6307,034	48	131,397		
	Total	15911,958	59			
ME1	Entre grupos	659829,409	11	59984,492	42,055	,000
	No interior dos grupos	68464,477	48	1426,343		
	Total	728293,886	59			
MDH2	Entre grupos	12161,303	11	1105,573	20,006	,000
	No interior dos grupos	2652,575	48	55,262		
	Total	14813,878	59			
G6PD	Entre grupos	44417,277	11	4037,934	10,917	,000
	No interior dos grupos	17754,206	48	369,879		
	Total	62171,482	59			

Continua...

Quadro A1. Continuação.

Conc. ou activ. enzimática	Origem de variância	Somados quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
GR	Entre grupos	24866,666	11	2260,606	36,329	,000
	No interior dos grupos	2986,869	48	62,226		
	Total	27853,534	59			
GPx	Entre grupos	41032,533	11	3730,230	24,434	,000
	No interior dos grupos	7327,988	48	152,666		
	Total	48360,520	59			
SOD1	Entre grupos	1989,300	11	180,845	16,013	,000
	No interior dos grupos	542,098	48	11,294		
	Total	2531,398	59			
SOD2	Entre grupos	23631,098	11	2148,282	31,351	,000
	No interior dos grupos	3289,150	48	68,524		
	Total	26920,248	59			
CTT1	Entre grupos	381,246	11	34,659	9,150	,000
	No interior dos grupos	181,811	48	3,788		
	Total	563,056	59			
CTA 1	Entre grupos	752,710	11	68,428	39,518	,000
	No interior dos grupos	83,115	48	1,732		
	Total	835,826	59			
GSH	Entre grupos	63195,644	11	5745,059	15,023	,000
	No interior dos grupos	18356,461	48	382,426		
	Total	81552,105	59			
GSSG	Entre grupos	6644,791	11	604,072	4,611	,000
	No interior dos grupos	6287,828	48	130,996		
	Total	12932,619	59			
GSH+2GSSG	Entre grupos	135418,126	11	12310,739	7,960	,000
	No interior dos grupos	74237,567	48	1546,616		
	Total	209655,693	59			
GSH/GSSG	Entre grupos	30,151	11	2,741	13,465	,000
	No interior dos grupos	9,771	48	,204		
	Total	39,923	59			
ROS	Entre grupos	472,189	11	42,926	5,743	,000
	No interior dos grupos	358,805	48	7,475		
	Total	830,994	59			
MDA	Entre grupos	27,015	11	2,456	6,745	,000
	No interior dos grupos	17,478	48	,364		
	Total	44,493	59			