

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

INFLUÊNCIA DO BUTIRATO EM PROCESSOS RELACIONADOS AO
METABOLISMO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Karine Falcão dos Santos

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INFLUÊNCIA DO BUTIRATO EM PROCESSOS RELACIONADOS AO
METABOLISMO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

KARINE FALCÃO DOS SANTOS

Orientador:

Dr. Cristiano Jorge Riger

Co-orientadora:

Dr^a. Edlene Ribeiro Prudêncio de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

SEROPÉDICA - RJ

Junho de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237 i Santos, Karine Falcão dos, 1997-
Influência do butirato em processos relacionados
ao metabolismo autofágico em células de *Saccharomyces
cerevisiae* / Karine Falcão dos Santos. - Seropédica,
2025.
122 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.
Coorientadora: Edlene Ribeiro Prudêncio de Souza.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Química, 2025.

1. Autofagia. 2. Butirato. 3. Disfunção. 4.
Estresse oxidativo. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I.
Riger, Cristiano Jorge , 1972-, orient. II. Souza,
Edlene Ribeiro Prudêncio de , 1991-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KARINE FACÃO DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/06/2025

Cristiano Jorge Riger Dr. UFRRJ (Orientador)

Daniela Consentino Gomes Dra. UFRRJ

Ana Lucia Tavares Gomes Dra. UFF



TERMO Nº 263/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)
(Nº do Documento: 521)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 24/06/2025 23:15)

CRISTIANO JORGE RIGER

DIRETOR DE INSTITUTO

IQ (11.39.00.21)

Matrícula: ###442#0

(Assinado digitalmente em 24/06/2025 14:49)

DANIELA COSENTINO GOMES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DBQ (11.39.00.24)

Matrícula: ###455#0

(Assinado digitalmente em 25/06/2025 15:23)

ANA LUCIA TAVARES GOMES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.187-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **521**, ano: **2025**, tipo:
TERMO, data de emissão: **24/06/2025** e o código de verificação: **10fadce39c**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Almir Batista dos Santos Filho e Simone Luzia da Paz Falcão dos Santos, por me ensinarem o valor da dedicação e por sempre me apoiarem com amor incondicional em cada etapa dessa jornada.

Minha profunda gratidão aos meus irmãos, Thiago e Caroline, e aos meus sobrinhos, Kauan, Melissa e Giovanna, pelo carinho, torcida e compreensão. Ao meu namorado, Mateus, por ser paciente e meu porto seguro em dias tempestuosos. E a minha cadelinha Amora por sua companhia e carinho que foram essenciais mediante ao luto pela perda da Kira.

Aos meus orientadores, Cristiano Jorge Riger e Edlene Ribeiro Prudêncio de Souza, agradeço por me guiarem nesta pesquisa. Suas preciosas sugestões e constante disponibilidade foram fundamentais para a construção deste trabalho. Foi uma honra aprender com pessoas que tanto admiro e estimo.

Aos meus companheiros do Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (LEOM): Dannel, Bárbara, Tamires, Rodrigo, Isabel, Nathalia e Thainá. Sou grata pela parceria, companheirismo e humor que tornaram essa caminhada mais leve e enriquecedora.

Agradeço à banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Daniela Consentino Gomes e Prof.^a Dr.^a Ana Lucia Tavares Gomes, pelas valiosas contribuições. À UFRRJ e ao corpo docente do PPGQ-UFRRJ pelo ensino de excelência e ao Prof. Dr. Claudio Akio Masuda (UFRJ) por gentilmente ceder as cepas utilizadas nesse estudo.

Por fim, agradeço aos meus guias espirituais por iluminaram o meu caminho com fé e propósito.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

RESUMO

SANTOS, Karine Falcão dos. **INFLUÊNCIA DO BUTIRATO EM PROCESSOS RELACIONADOS AO METABOLISMO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae***. 2025. 122p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. 2025.

O butirato é um metabólito gerado a partir da fermentação de fibras alimentares por bactérias intestinais, podendo ser utilizado em diferentes vias metabólicas de células eucarióticas. A autofagia é uma das principais vias de degradação intracelular e consiste no processo de remoção de componentes citoplasmáticos prejudiciais às células, e disfunções nessa via estão correlacionadas ao surgimento e à progressão de diversas patologias, como o câncer e doenças neurodegenerativas. Neste estudo buscou-se avaliar a influência do butirato em etapas do processo autofágico usando células de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em proteínas importantes para a manutenção da autofagia ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$). A análise da toxicidade do butirato na cepa controle demonstrou através de curvas de crescimento e viabilidade celular que entre 50 μM e 200 μM não houve qualquer efeito tóxico. Nos ensaios com cepas mutantes na concentração de 100 μM de butirato, as células das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ tiveram uma redução da atividade metabólica. Com a indução de autofagia por privação de nitrogênio, observou-se que após 4 h não houve alteração da viabilidade celular com a exposição ao butirato. Entretanto, após 24 h, as cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ apresentaram uma redução na viabilidade celular, comportamento associado ao aumento da frequência de colônias pequenas (*petite*) e dos níveis elevados de oxidação intracelular. Esses resultados demonstraram que, embora o butirato não seja citotóxico para *S. cerevisiae* em condições nutricionais adequadas, sua metabolização sob estresse nutricional revela o papel essencial de proteínas-chave como a Gcn4p e Pep4p. Essa observação ressalta a importância das vias de regulação de estresse e de degradação autofágica para a resposta adaptativa e sobrevivência celular da levedura em condições nutricionais adversas.

Palavras chaves: Autofagia. Butirato. Disfunção. Estresse oxidativo. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

SANTOS, Karine Falcão dos. **INFLUENCE OF BUTYRATE ON PROCESSES RELATED TO AUTOPHAGIC METABOLISM IN *Saccharomyces cerevisiae* CELLS**. 2025. 122p. Dissertation (Master's in Chemistry, Medicinal and Biological Chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. 2025.

Butyrate is a metabolite generated from the fermentation of dietary fibers by intestinal bacteria, and can be used in different metabolic pathways of eukaryotic cells. Autophagy is one of the main pathways of intracellular degradation, consisting of the process of removing cellular components that are harmful to cells. Dysfunctions in this pathway are correlated with the onset and progression of various diseases, such as cancer and neurodegenerative disorders. In this study, we sought to evaluate the influence of butyrate on steps of the autophagic process using *Saccharomyces cerevisiae* cells deficient in proteins important for the maintenance of autophagy ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$, and $\Delta pep4$). Analysis of butyrate toxicity in the control strain demonstrated through growth curves and cell viability that concentrations between 50 μ M and 200 μ M had no toxic effect. In assays with the mutant strains at a concentration of 100 μ M of butyrate, cells of the $\Delta gcn4$ and $\Delta pep4$ strains showed a reduction in metabolic activity. When autophagy was induced by nitrogen starvation, it was observed that after 4 h, there was no change in cell viability with butyrate exposure. However, after 24 h, the $\Delta gcn4$ and $\Delta pep4$ strains showed a reduction in cell viability, a behavior associated with an increased frequency of petite colonies and high levels of intracellular oxidation. These results demonstrated that, although butyrate is not cytotoxic to *S. cerevisiae* under adequate nutritional conditions, its metabolism under nutritional stress reveals the essential role of key proteins such as Gcn4p and Pep4p. This observation highlights the importance of stress regulation and autophagic degradation pathways for the adaptive response and cell survival of yeast under adverse nutritional conditions.

Keywords: Autophagy. Butyrate. Dysfunction. Oxidative stress. *Saccharomyces cerevisiae*.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: As três principais vias de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas	20
Figura 2: Diferença entre a autofagia inespecífica e a autofagia seletiva	21
Figura 3: Esquema simplificado do processo autofágico e suas diferentes etapas...	24
Figura 4: Regulação da autofagia mediada pela ação da quinase TORC1p.....	26
Figura 5: Recrutamento dos componentes proteicos e de membrana na etapa de nucleação.....	27
Figura 6: Esquema da formação dos sistemas de conjugação responsáveis pela expansão do fagóforo.....	29
Figura 7: Expansão do fagóforo e formação do autofagossomo.	30
Figura 8: Fusão do autofagossomo com o vacúolo e sua degradação	31
Figura 9: Esquema do controle translacional de síntese de Gcn4p	34
Figura 10: Esquema da cascata proteolítica de hidrolases e proteases iniciada por Pep4p.....	37
Figura 11: Fórmula molecular, peso molecular e estrutura bidimensional e tridimensional do butirato	39
Figura 12: Biossíntese do butirato durante a fermentação bacteriana no intestino ...	41
Figura 13: Gradiente de concentração decrescente de butirato do lúmen colônico para a cripta	42
Figura 14: A interferência do butirato no metabolismo celular pela interação com os GPCRs ou por transportadores monocarboxilatos	43

Figura 15: Vias de regulação da acetilação das histonas pelo butirato em diferentes concentrações	46
Figura 16: Esquema da β -oxidação do butirato no peroxissomo e na mitocôndria ...	48
Figura 17: O butirato influencia a autofagia através da modulação das vias PI3K/Akt/TOR e AMPK.....	51
Figura 18: Determinação da taxa de crescimento celular específica (μ) a partir da curva de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
Figura 19: Princípio do ensaio da resazurina	57
Figura 20: Curva de crescimento celular da cepa BY4741	61
Figura 21: Análise da toxicidade do butirato de sódio por viabilidade celular.	63
Figura 22: Fluorescência da resorufina na cepa BY4741 e em suas mutantes isogênicas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ com e sem exposição ao butirato de sódio por 24 h	66
Figura 23: Viabilidade celular da cepa controle (BY4741) em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio.....	69
Figura 24: Viabilidade celular da cepa $\Delta gcn4$ em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio	71
Figura 25: Viabilidade celular da cepa $\Delta atg8$ em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio	73
Figura 26: Viabilidade celular da cepa $\Delta pep4$ em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio	75
Figura 27: Diferença entre as colônias com tamanho padrão e as colônias <i>petite</i>	78
Figura 28: Formação de colônias <i>petite</i> das cepas BY4741 e mutantes no processo autofágico tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 4 h.....	79

Figura 29: Formação de colônias <i>petite</i> das cepas BY4741 e mutantes no processo autofágico tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 24 h	81
Figura 30: Oxidação intracelular da cepa BY4741 e das cepas mutantes na autofagia ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$) tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 4 h	85
Figura 32: Oxidação intracelular da cepa BY4741 e das cepas mutantes na autofagia ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$) tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 24 h	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa BY4741 exposta a diferentes concentrações de butirato de sódio ao longo de 24 h.	61
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AAP1 - Alanina-arginina aminopeptidase

ACL - Enzima ATP-citrato liase

AGCCs - Ácidos graxos de cadeia curta

Akt - Proteína quinase B

AMP - Adenosina monofosfato

AMPK - Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

APGs - Genes relacionados à autofagia

ATP - Adenosina trifosfato

ATGs - Genes relacionados à autofagia

AUTs - Genes relacionados à autofagia

CMA - Autofagia mediada por chaperonas

eIF2 - Fator de iniciação 2

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GAAC - Controle geral de aminoácidos

GPCRs - Receptores acoplados a proteína G

H₂DCFDA - 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HAT - Histona acetiltransferase

HDAC - Histona desacetilase

Lap4p - Aminopeptidase vacuolar

MCTs - Transportadores de monocarboxilato

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PAS - Sítio de montagem do fagóforo

PE - Lipídeo fosfatidiletanolamina

PI3K - Complexo I da fosfatidilinositol-3 quinase

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3 - Trifosfato de fosfatidilinositol

RE – Retículo endoplasmático

SARs - Receptores seletivos de autofagia

SD - Synthetic Defined

SD-N - Synthetic Defined (sem nitrogênio)

SMCTs - Transportadores de monocarboxilato por cotransporte com sódio

SNAREs - Receptor de proteína de ligação do componente sensível à N-etilmaleimida solúvel

TCA - Ciclo do ácido tricarboxílico

TOR - Complexo alvo da rapamicina

TORC1p - Complexo 1 de TOR

TORC2p - Complexo 2 de TOR

UPR – Resposta a proteínas não dobradas

YPD - Yeast Extract Peptone Dextrose

Yno1p - NADPH oxidase de levedura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Autofagia	18
2.2. Tipos de autofagia.....	19
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Um organismo modelo para o estudo da autofagia 22	
2.4. Mecanismo molecular da autofagia: Indução da biogênese do autofagossomo e a sua degradação.....	23
2.4.1. Indução do processo autofágico	25
2.4.2. Iniciação e nucleação do fagóforo.....	26
2.4.3. Expansão e fechamento do fagóforo	28
2.4.4. Fusão do autofagossomo com o vacúolo, degradação da carga autofágica e reciclagem de nutrientes.....	30
2.5. Disfunção do processo autofágico e seu impacto na saúde	32
2.5.1. Gcn4p: Um fator de transcrição essencial para iniciar a autofagia 33	
2.5.2. Atg8p: Fundamental para a formação do autofagossomo	35
2.5.3. Pep4p: Proteinase importante para a degradação.....	36
2.5.4. Doenças associadas a disfunção autofágica e a busca por compostos com potencial terapêutico	37
2.6. Butirato.....	38
2.6.1. Microbiota intestinal e a biossíntese do butirato.....	39
2.7. Metabolização do butirato	43
2.7.1. Regulação epigenética impulsionada pelo butirato	45
2.7.2. β -oxidação do butirato: uma fonte de energia celular	47
2.8. Butirato e a autofagia	48
3. OBJETIVOS.....	52

3.1.	Objetivo geral	52
3.2.	Objetivos específicos	52
4.	MATERIAIS E METODOLOGIAS	53
4.1.	Materiais.....	53
4.1.1.	Preparo da solução de Butirato de sódio	53
4.1.2.	Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
4.1.3.	Meios de cultivo	53
4.2.	Metodologias	54
4.2.1.	Condições de cultivo	54
4.2.2.	Curva de crescimento	54
4.2.3.	Cálculo da taxa de crescimento celular máxima ($\mu_{\text{máx}}$)	55
4.2.4.	Viabilidade celular da curva de crescimento	56
4.2.5.	Ensaio de viabilidade com resazurina	56
4.2.6.	Viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio	58
4.2.7.	Quantificação de colônias <i>petite</i>	58
4.2.8.	Níveis de espécies reativas de oxigênio total.....	58
4.2.9.	Análise estatística	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1.	Avaliação de citotoxicidade do butirato em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
5.1.1.	Cepa BY4741: Análise da taxa específica de crescimento e viabilidade celular.....	60
5.1.2.	Cepas mutantes em <i>Δatg8</i> , <i>Δgcn4</i> e <i>Δpep4</i> : Avaliação da atividade metabólica	64
5.2.	Investigação da influência do butirato no metabolismo autofágico...	68
5.2.1.	Avaliação da viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio.....	68

5.2.1.1. Cepa BY4741	68
5.2.1.2. Cepa $\Delta gcn4$	71
5.2.1.3. Cepa $\Delta atg8$	73
5.2.1.4. Cepa $\Delta pep4$	74
5.2.2. Formação de colônias <i>petite</i> durante a viabilidade celular.....	77
5.2.2.1. Influência do butirato na formação de <i>petite</i> em 4h.....	79
5.2.2.2. Influência do butirato na formação de <i>petite</i> em 24 h.....	80
5.2.3. Influência do butirato sobre a oxidação intracelular nas cepas mutantes no processo autofágico	84
5.2.3.1. Oxidação intracelular em 4 h	85
5.2.3.2. Oxidação intracelular em 24 h	87
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

A geração de proteínas, metabólitos e organelas é indispensável para a manutenção de diversos processos biológicos importantes no desenvolvimento de células e tecidos, participando de eventos como crescimento, sobrevivência e morte celulares. Entretanto, o acúmulo de enzimas disfuncionais, agregados proteicos e organelas danificadas e/ou envelhecidas pode resultar em uma perturbação de processos celulares, podendo gerar danos às células e até mesmo induzir a apoptose ou necrose celulares. Como forma de contornar esses danos e manter um estado de homeostase citoplasmática, as células desenvolveram vias de depuração intracelular que permitem conservar o equilíbrio entre a síntese e a degradação desses componentes citoplasmáticos.

Filogeneticamente antiga e evolutivamente conservada, a autofagia é considerada uma das principais vias de degradação e reciclagem celular, sendo encontrada em todas as células eucarióticas; desde organismos unicelulares, como leveduras, até organismos mais complexos, como mamíferos. Esse processo celular é formado por múltiplos mecanismos nos quais o conteúdo citoplasmático disfuncional é sequestrado para o interior de vesículas citosólicas de dupla membrana, chamadas de autofagossomos, que são translocadas para organelas como vacúolos/lisossomos onde ocorre a degradação. Os metabólitos gerados no processo de degradação são liberados de volta para o citosol e reutilizados como fonte de energia ou como blocos de construção para a síntese de macromoléculas. Apesar de ocorrer de forma constitutiva em um nível basal na maioria das células eucarióticas, existem fatores que podem induzir o processo autofágico, como o estresse nutricional ocasionado pela restrição de nitrogênio. Em resposta a essa condição, as células induzem a reciclagem de nutrientes pela via autofágica como um mecanismo adaptativo, uma vez que a ausência de nitrogênio pode comprometer a biossíntese de biomoléculas importantes, como as proteínas.

A disfunção da autofagia ocasionada por defeitos genéticos tem sido implicada na patogênese de diversas doenças, incluindo neurodegeneração, tumorigênese, doença de Crohn, doenças cardiovasculares e doenças metabólicas, como a diabetes. Diante disso, a investigação das propriedades químicas e biológicas de compostos dietéticos ou produzidos pela microbiota intestinal que auxiliem na regulação da

autofagia se torna relevante. A compreensão do impacto desses compostos nas diferentes etapas da autofagia pode fornecer informações essenciais para decifrar suas ações biológicas e, futuramente, auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças relacionadas a disfunções nessa via.

O butirato é um metabólito primário presente em diversos líquidos e tecidos biológicos e pode ser gerado por meio da fermentação anaeróbica de fibras alimentares pelo metabolismo de bactérias entéricas. Este ácido graxo de cadeia curta é capaz de atuar como mediador sistêmico, através da indução de respostas metabólicas que auxiliam na homeostase celular de diferentes tipos celulares. Conhecido pela sua capacidade em inibir a desacetilação de histonas, o butirato é capaz de atuar em importantes vias metabólicas desempenhando diversas atividades benéficas para a saúde celular. Dentre os metabolismos que podem ser regulados pela ação do butirato estão a progressão/inibição do ciclo celular, apoptose e autofagia.

Este estudo tem como intuito avaliar a influência do butirato em processos relacionados ao metabolismo autofágico em células de *Saccharomyces cerevisiae* durante a indução da autofagia por privação de nitrogênio. O foco desse estudo está relacionado à investigação da influência do butirato sobre etapas do metabolismo autofágico em leveduras, a partir da deficiência de genes que expressam as proteínas Gcn4p, Atg8p e Pep4p, cujos ortólogos são encontrados em eucariotos superiores. A proteína Gcn4p é um ativador transcricional de genes responsáveis por modular múltiplas vias diferentes de resposta ao estresse, incluindo a autofagia. A Atg8p é uma proteína essencial para formação e maturação do autofagossomo. Já a Pep4p é uma protease vacuolar importante para a maturação de várias hidrolases vacuolares e participa da degradação da carga autofágica. A ausência dessas proteínas ocasiona a perda da capacidade de induzir o processo autofágico, e a incapacidade de formação e degradação do autofagossomo, respectivamente (Alao *et al.*, 2023; Ohsumi *et al.*, 2014; Kerstens *et al.*, 2018).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada como organismo modelo para o estudo da autofagia, principalmente devido a sua via autofágica ser a mais elucidada na literatura, possuindo muitos genes e proteínas análogas pertencentes a vias conservadas em humanos, refletindo o alto grau de conservação geral da via. Além disso, a levedura trata-se de um modelo eucariótico simples e que

permite fácil modificação genética, possibilitando o estudo de disfunções pontuais do processo autofágico e possuindo uma gama de métodos estabelecidos que permitem monitorar a autofagia.

Estudos recentes demonstraram que o butirato foi capaz de induzir a autofagia, e até mesmo restaurar o fluxo autofágico em células com a autofagia prejudicada devido a exposição a inibidores dessa via (Mohamed *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2021). Entretanto, pouco se sabe sobre como tal composto em baixas concentrações pode afetar as diferentes etapas do processo autofágico; portanto, a investigação de como o butirato pode atuar nas cepas deletadas em *GCN4*, *ATG8* e *PEP4* torna-se importante para a análise do seu provável papel sobre o metabolismo autofágico. Para esse fim utilizou-se experimentos de viabilidade celular, viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio, análise de formação de colônias *petite* e oxidação intracelular, com o objetivo de averiguar a influência do butirato sobre o processo autofágico em células de *Saccharomyces cerevisiae* sob a indução da autofagia mediada pela privação de aminoácidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Autofagia

A conservação da homeostase celular por meio de um equilíbrio harmônico entre a construção e a degradação de componentes citoplasmáticos é fundamental para o desenvolvimento de células eucarióticas saudáveis (Yin *et al.*, 2020). Evolutivamente conservada em todos os eucariotos, a autofagia é uma via catabólica importante de reaproveitamento celular capaz de reciclar nutrientes (Sturgeon *et al.*, 2019), promovendo a remoção de macromoléculas citoplasmáticas e organelas envelhecidas e/ou danificadas, onde estes componentes presentes no citoplasma são translocados até o lisossomo/vacúolo para serem degradados (Tyler *et al.*, 2018; Leary *et al.*, 2022).

Estudos sugerem que o processo autofágico evoluiu como um mecanismo celular presente em organismos unicelulares para a sobrevivência mediante a escassez de nutrientes, e ao longo da evolução esta foi aprimorada para desempenhar funções celulares adicionais (Kourtis *et al.*, 2009; He *et al.*, 2018). Em condições normais a autofagia é responsável por regular funções fisiológicas intracelulares, como a renovação citoplasmática que inclui proteínas e organelas para a manutenção da homeostase celular. Entretanto, o processo autofágico pode ser intensificado mediante a sua indução devido a inúmeras condições de estresse ocasionados por estímulos ambientais, atuando como um mecanismo citoprotetor (Kuchitsu *et al.*, 2018). Adicionalmente, defeitos na via autofágica estão associados a condições patológicas como câncer e doenças neurodegenerativas; e, por isso, compreender seu funcionamento é fundamental para entender como disfunções nessa via podem impactar a homeostase celular (Khandia *et al.*, 2019).

O termo “autofagia” deriva da palavra grega “autóphagos”, que significa “autodevorador”. Esse termo, juntamente com a sua definição, foi descrito pela primeira vez por Christian de Duve em 1963 no Simpósio da Fundação CIBA sobre lisossomo, onde a partir de suas observações microscópicas de organelas em células de fígado de rato verificou a degradação de componentes citoplasmáticos em uma nova organela, denominada de lisossomo (Deter *et al.*, 1967; Ichimiya *et al.*, 2020; Pandarathodiyil *et al.*, 2021). Apesar da autofagia ser investigada durante décadas, o modo como componentes citoplasmáticos eram entregues ao lisossomo/vacúolo e

quais biomoléculas estavam envolvidas nesse transporte permaneceram sem identificação até a década de 90. No início dos anos 90, um grupo de pesquisa liderado por Yoshinori Ohsumi foi responsável pela identificação dos autofagossomos e por uma triagem genética em células de levedura, que resultou no isolamento de 15 mutantes de levedura que apresentavam defeitos na autofagia (Tsukada *et al.*, 1993; Mizushima, 2017). Essa pesquisa desencadeou a descoberta de uma gama de genes relacionados à autofagia, os quais, em 2003, foram unificados e nomeados como ‘*autophagy-related genes*’, abreviados como ATGs (Klionsky *et al.*, 2003). Como esses genes mostraram-se com alto grau de conservação entre os eucariotos, a expansão do estudo da autofagia progrediu rapidamente em muitos outros organismos modelos; permitindo a descoberta de diferentes tipos de autofagia.

2.2. Tipos de autofagia

A autofagia pode ser classificada pelas vias de entrega de componentes citoplasmáticos ao lisossomo/vacúolo. Esse processo abrange três principais tipos de autofagia: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (CMA). A macroautofagia é a principal via autofágica e é onde grandes porções do citoplasma e organelas são envoltas pelo autofagossomo, que após sua maturação é fundido ao lisossomo/vacúolo para a degradação dos componentes citosólicos sequestrados (Shaid *et al.*, 2013). Já na microautofagia e no CMA a carga autofágica é incorporada diretamente ao lisossomo/vacúolo, sendo o sequestro promovido pela própria superfície da organela ou pela entrega de proteínas solúveis diretamente a receptores de sua membrana, respectivamente (**Figura 1**) (Yang *et al.*, 2010). É válido ressaltar que, entre esses tipos de autofagia, somente a autofagia mediada por chaperonas não está presente em fungos (Metur *et al.*, 2024).

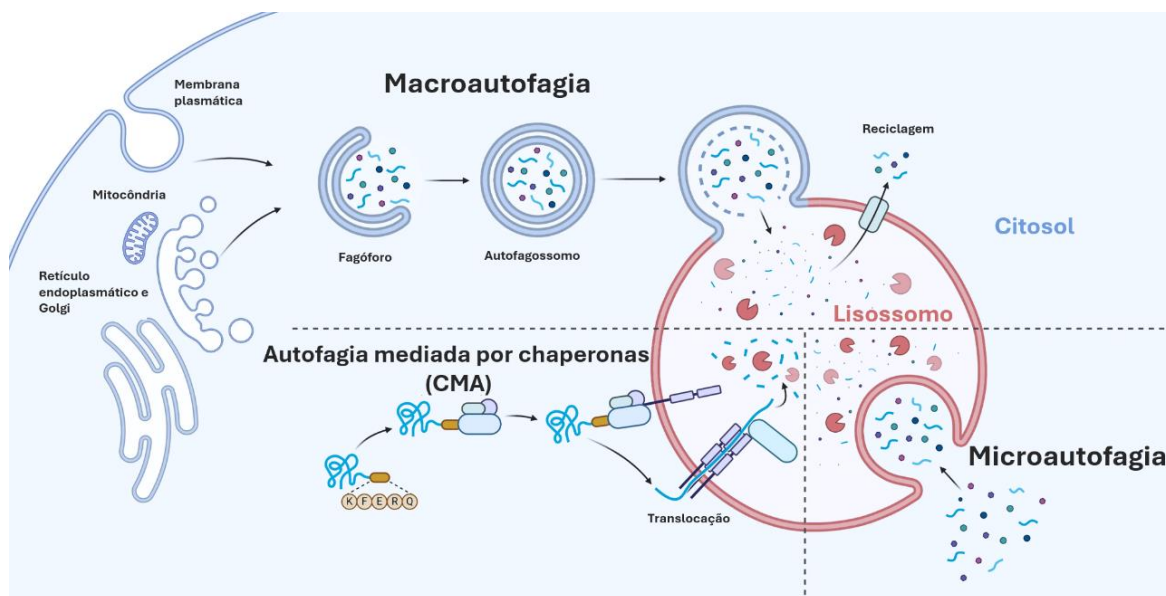


Figura 1: As três principais vias de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Apesar de apresentarem mecanismos distintos, todas as vias convergem na entrega da carga autofágica ao lisossomo/vacúolo, entretanto a via autofágica CMA não está presente em fungos. Disponível em: <<https://biospective.com/resources/autophagy-neurodegenerative-diseases>>. Acesso em: 16 abr. 2025.

Além dessa classificação, a macroautofagia pode ser dividida entre autofagia seletiva e autofagia inespecífica (**Figura 2**). A autofagia seletiva consiste na identificação de uma carga-alvo por receptores específicos responsáveis por sequestrá-la e direcioná-la aos autofagossomos para sua degradação, visando especificamente a degradação de organelas danificadas ou patógenos intracelulares (Shaid *et al.*, 2013; Zaffagnini *et al.*, 2016). Este processo tem sido bem caracterizado e pode ser classificado de acordo com o tipo de carga-alvo, por exemplo, mitofagia (mitocôndrias), pexofagia (peroxissomo) ou xenofagia (patógenos invasores) (Feng *et al.*, 2014). Na autofagia inespecífica uma parte aleatória do citosol é capturada durante a formação do autofagossomo, e eventualmente degradada com o intuito de renovar completamente o citoplasma sob condições de estresse nutricional (Feng *et al.*, 2014; George *et al.*, 2000). Portanto, este estudo tem como foco principalmente a macroautofagia inespecífica, que será referida neste trabalho como autofagia.

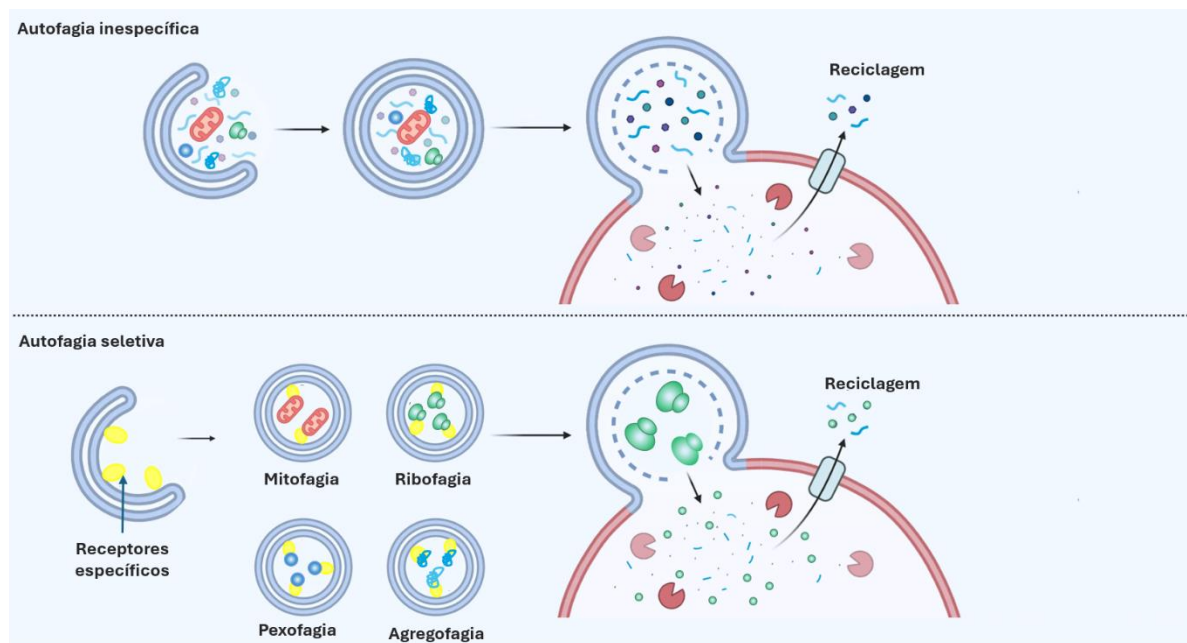


Figura 2: Diferença entre a autofagia inespecífica e a autofagia seletiva. A macroautofagia pode ser dividida em autofagia seletiva e autofagia inespecífica de acordo com o estado nutricional ou com a necessidade de degradação de componentes citoplasmáticos específicos. Fonte: Elaborada pelo autor.

Existem diferenças substanciais entre a autofagia realizada por eucariotos superiores multicelulares, como os mamíferos, e os eucariotos inferiores. Isso pois, ao longo da evolução, à medida que células eucarióticas superiores desenvolveram redes mais complexas de sinalização e especializações no maquinário autofágico; os eucariotos inferiores, como as leveduras, evoluíram para um sistema autofágico mais simplificado (King *et al.*, 2012). Talvez a diferença mais óbvia seja a organela destino da carga autofágica, que em células de eucariotos superiores, exceto em plantas, são os lisossomos, enquanto em células eucarióticas inferiores a degradação costuma ser em vacúolos (Klionsky *et al.*, 2013). Apesar das diferenças, a autofagia é altamente conservada e muitos dos mecanismos autofágicos presentes em eucariotos inferiores estão preservados em eucariotos superiores, possibilitando correlações entre esses organismos (Delorme-Axford *et al.*, 2015). Por apresentarem um processo autofágico mais simples, eucariotos inferiores como a *Saccharomyces cerevisiae* tornaram-se organismos modelo que possibilitam estudos mais aprofundados visando uma melhor compreensão do processo autofágico.

2.3. *Saccharomyces cerevisiae*: Um organismo modelo para o estudo da autofagia

O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo biológico para o estudo de processos celulares básicos, que também estão presentes em organismos multicelulares complexos, como os humanos, foi extremamente útil para importantes descobertas biológicas. Este eucarioto unicelular, pertencente ao reino fungi e ao filo Ascomycota, foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, e é o que mais apresenta informações detalhadas de seus genes em bancos de dados, recebendo atualizações contínuas até os dias de hoje (Goffeau *et al.*, 1996; Bharadwaj *et al.*, 2020). Após o sequenciamento de seu genoma, métodos de manipulação genética permitiram desde modificações no seu genoma a deleção de genes por recombinação homóloga, possibilitando a criação de conjuntos de levedura com deleções (Torggler *et al.*, 2017; Cazzanelli *et al.*, 2018).

Além da facilidade de manipulação do genoma, outros fatores colaboram para a escolha da *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Por se tratar de um eucarioto unicelular, a levedura possui uma estrutura e organização celular preservada, que se assemelha à de células eucarióticas superiores (Liu *et al.*, 2017). Além disso, quando comparadas a outros organismos mais complexos, é possível perceber a semelhança entre sequências de aminoácidos e as funções de algumas proteínas conservadas entre os organismos (Cazzanelli *et al.*, 2018). Ademais, seu ciclo de vida curto, condições de crescimento simples e a proliferação em meios de cultivo não-complexos facilitam seu custo de manutenção em laboratório, tornando-a um organismo modelo acessível para o estudo de funções biológicas e vias metabólicas (Guarienti *et al.*, 2010).

Uma das vias metabólicas a qual a *Saccharomyces cerevisiae* foi empregada como organismo modelo foi a via autofágica. Estudos nesse microrganismo levaram à identificação de fatores especificamente envolvidos no processo autofágico; como as proteínas ATGs e a caracterização dos mecanismos moleculares relacionados à regulação e execução da via (Cebollero *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2010). A triagem genética realizada nessa levedura possibilitou a identificação de mais de 40 genes associados ao processo autofágico e, significativamente, muitos desses genes mostraram-se conservados em diversos organismos, como plantas e mamíferos, possibilitando a comparação entre os organismos (Metur *et al.*, 2024).

Embora essas descobertas tenham servido de base para estudos em células de mamíferos, a levedura ainda permanece como um organismo modelo altamente relevante para o estudo da autofagia devido os benefícios em se trabalhar com esse organismo. Dentre os benefícios de utilizar a levedura como organismo modelo está a facilidade em aplicar procedimentos genéticos nas leveduras, permitindo a criação de um conjunto de leveduras deletadas em genes de proteínas relacionadas ao sistema autofágico; e a inserção de plasmídeos para promover a superexpressão de genes relacionados à autofagia (Cazzanelli *et al.*, 2018; Noda *et al.*, 2008). Isso possibilita a compreensão da função bioquímica da proteína-alvo de análise e os impactos ocasionados pela sua ausência ou excesso na autofagia. Outra vantagem é a preservação das principais cascatas de sinalização que modulam o processo autofágico, como a via TOR, permitindo o estudo da regulação da autofagia por essas vias de sinalização na levedura (Cebollero *et al.*, 2009). Por fim, há uma diversidade de métodos experimentais e reagentes específicos que estão disponíveis para o estudo da autofagia em *Saccharomyces cerevisiae* que permitem avaliar e monitorar vários estágios da autofagia (Vanderwaeren *et al.*, 2022; Matthew *et al.*, 2015; Shintani *et al.*, 2004).

Mediante a estes benefícios, o uso desse microrganismo nos estudos da autofagia facilita a compreensão dos mecanismos moleculares do processo autofágico, possibilitando assim um maior entendimento de como a via é regulada e os impactos da disfunção autofágica na homeostase celular.

2.4. Mecanismo molecular da autofagia: Indução da biogênese do autofagossomo e a sua degradação

A autofagia inicia-se com o recrutamento de proteínas da via autofágica para a estrutura pré-autofagossômica, onde uma membrana de dupla camada lipídica, conhecida como fagóforo, começa a ser formada. Esse fagóforo é expandido para englobar organelas e outros conteúdos citosólicos até tornar-se uma vesícula membranosa, denominada autofagossomo. O autofagossomo carregado funde-se com o lisossomo/vacúolo e sua carga é degradada por proteases ácidas, onde as biomoléculas resultantes dessa degradação são transportadas de volta para o citoplasma e podem ser reaproveitadas na construção de macromoléculas ou utilizadas no metabolismo celular (**Figura 3**) (Glick *et al.*, 2010; Child *et al.*, 2022; Reggiori *et al.*, 2013).

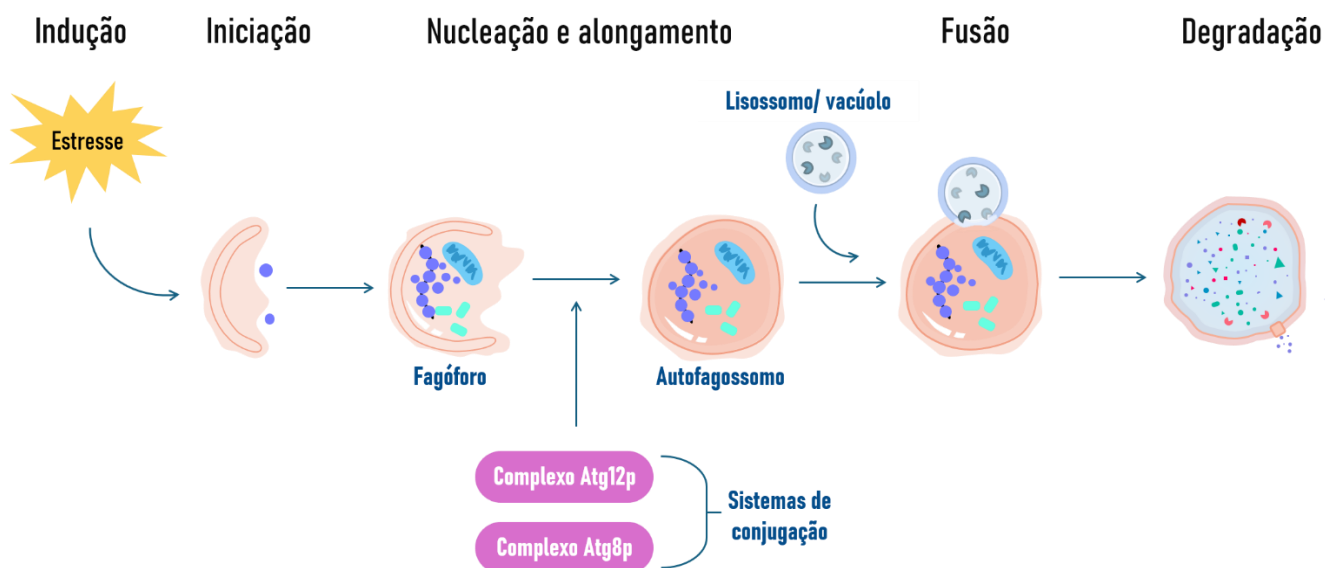


Figura 3: Esquema simplificado do processo autofágico e suas diferentes etapas. A autofagia compreende as seguintes etapas: indução, iniciação, nucleação, expansão, fusão e degradação/reciclagem. Fonte: Elaborada pelo autor.

O funcionamento da autofagia envolve a formação de diversos complexos proteicos importantes e duas etapas de conjugação que se assemelham ao processo de conjugação da ubiquitina, onde a junção das proteínas é catalisada por diversas enzimas (Kaushik *et al.*, 2011). Essas proteínas envolvidas nessa via são codificadas por genes relacionados à autofagia, conhecidos como ATGs, e desempenham papéis essenciais em todas as diferentes fases do processo autofágico (Ornatowski *et al.*, 2020). O mecanismo geral do processo autofágico ocorre por meio de várias etapas, podendo ser discriminadas da seguinte forma: indução do processo autofágico; iniciação e nucleação do fagóforo; expansão e fechamento do fagóforo, que culmina na formação do autofagossomo; fusão entre o autofagossomo e o lisossomo/vacúolo; e degradação e reciclagem dos componentes citoplasmáticos sequestrados. Estes estágios são preservados desde leveduras até células de mamíferos superiores. A principal diferença, no entanto, reside na organela responsável pela degradação: em eucariotos superiores, essa organela é o lisossomo, enquanto em plantas e leveduras, é o vacúolo (Chang, 2020). A seguir, essas etapas são descritas com maiores detalhes com foco direcionado ao mecanismo autofágico da *Saccharomyces cerevisiae*, o organismo modelo escolhido para esse estudo.

2.4.1. Indução do processo autofágico

A autofagia pode ocorrer naturalmente nas células eucarióticas em níveis basais. Esse processo é conhecido como autofagia constitutiva e tem como intuito a manutenção da homeostase celular (Delorme-Axford *et al.*, 2015). Entretanto, durante a fase de indução, a autofagia é regulada positivamente aumentando o fluxo autofágico como uma forma de resposta aos diferentes estímulos intrínsecos e extrínsecos que as células possam sofrer, resultando em uma mudança da autofagia constitutiva basal para a autofagia induzida (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Existem diversos estímulos fisiológicos que podem ocasionar a indução do processo autofágico; como, por exemplo, estresse oxidativo (Li *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2009), infecção por patógenos (Datan *et al.*, 2016), utilização de compostos sintéticos, como a rapamicina (Delorme-Axford *et al.*, 2015), e o estresse nutricional pela falta de nutrientes, como aminoácidos e glicose (Kuchitsu *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022).

As privações nutricionais são os estímulos mais comuns que desencadeiam a autofagia. A remoção de fontes de carbono, aminoácidos auxotróficos ou ácidos nucleicos podem induzir a autofagia (Mizushima, 2007). No entanto, a restrição de nitrogênio é o estímulo mais utilizado no estudo do processo autofágico em *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua eficiência em provocar a resposta autofágica de maneira mais ampla e rápida que as demais privações (Cebollero *et al.*, 2009). Pelo fato do nitrogênio estar presente na constituição de biomoléculas e em vias vitais para o funcionamento celular, como em biossínteses de aminoácidos, nucleotídeos e proteínas; a ausência da disponibilidade de fontes de nitrogênio no ambiente celular pode ocasionar uma diminuição drástica da concentração de aminoácidos e o consequente comprometimento na síntese total de proteínas, podendo levar à morte celular em períodos longos de privação (Metur *et al.*, 2023; Metur *et al.*, 2024). Portanto, as células desenvolveram centros de detecção metabólica que permitem orquestrar sistemas intrincados de expressão gênica e regular respostas metabólicas, como a autofagia, por meio de vias de sinalização baseadas na concentração de nutrientes (Khandia *et al.*, 2019).

O complexo alvo da rapamicina (TOR) consiste em uma proteína quinase serina/treonina, que funciona como um sensor central de fatores de crescimento, sinalização de nutrientes e estado energético (Alao *et al.*, 2023). Nas leveduras existem dois complexos de TOR distintos: o TORC1p e o TORC2p, sendo o TORC1p conhecido por sua função primária na regulação do crescimento celular e da autofagia mediada pela disponibilidade de nutrientes (Jewell *et al.*, 2013). Em condições ricas em nutrientes, a TORC1p é ativada e promove a hiperfosforilação da proteína autofágica Atg13, impedindo a formação do complexo Atg1p e com isso reprimindo o início da autofagia (**Figura 4a**) (Noda, 2017; Alers *et al.*, 2012). Durante a privação de nitrogênio, a TORC1p é inativada mediante a fosforilação ocasionada pela ação de quinases, como a Gcn2p e a Snf1p, resultando na desfosforilação de Atg13p e permitindo a formação do complexo Atg1p mediada pela regulação da Snf1p, um ortólogo da AMPK de mamíferos em leveduras (**Figura 4b**) (Yuan *et al.*, 2017; Coccetti *et al.*, 2018). A formação do complexo Atg1p e seu recrutamento para o sítio de montagem do fagóforo (PAS) dá início ao processo autofágico.

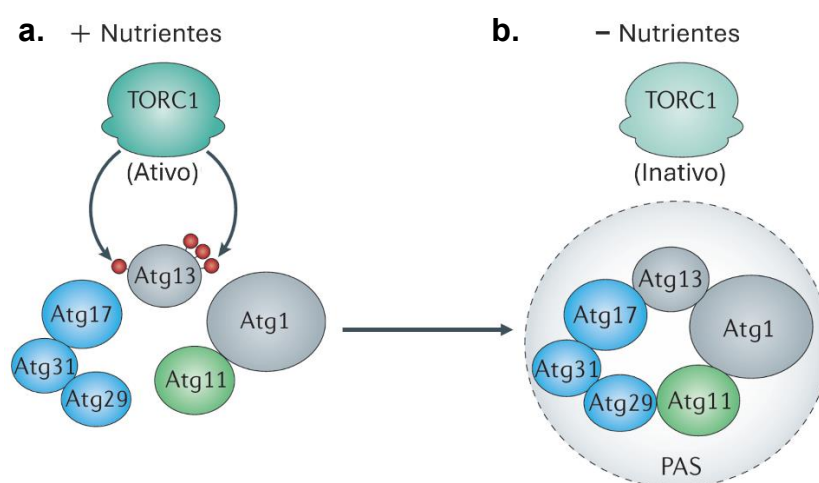


Figura 4: Regulação da autofagia mediada pela ação da quinase TORC1p. Em ambientes com abundância de nutrientes (a), a TORC1p ativada impede a formação do complexo Atg1p ao fosforilar excessivamente a Atg13p, bloqueando a autofagia. Em contrapartida, sob escassez de nutrientes (b), a inativação da TORC1p possibilita a montagem do complexo Atg1p e sua ligação ao PAS, deflagrando o processo de autofagia em leveduras (Farré *et al.*, 2016 - ADAPTADA).

2.4.2. Iniciação e nucleação do fagóforo

Em células de *Saccharomyces cerevisiae*, a autofagia é iniciada em uma região específica denominada de sítio de montagem do fagóforo, também conhecida como

estrutura pré-autofagossômica (PAS). Localizado próximo ao vacúolo, esta região é lugar de recrutamento de todos os componentes proteicos e de membrana fundamentais para a biogênese do autofagossomo (Stanley *et al.*, 2014). O complexo ternário Atg17p, Atg29p e Atg31p, pertencentes ao complexo Atg1p, são intrínsecos à região do PAS independente das condições nutricionais. Na inanição, a desfosforilação da Atg13p permite a sua interação proteica com a quinase Atg1 e o complexo Atg17p-Atg29p-Atg31p, formando o complexo Atg1p na região do PAS (**Figura 4**) (Mao *et al.*, 2013). Este complexo é essencial para o recrutamento da maquinaria autofágica e organização do PAS. Posteriormente à formação de Atg1p, um pequeno número de vesículas lipídicas geradas no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (RE), contendo a proteína transmembrana Atg9p, são transportadas ao PAS e recrutadas pelo complexo Atg1p (**Figura 5**) (Tyler *et al.*, 2018; Maruyama *et al.*, 2021).

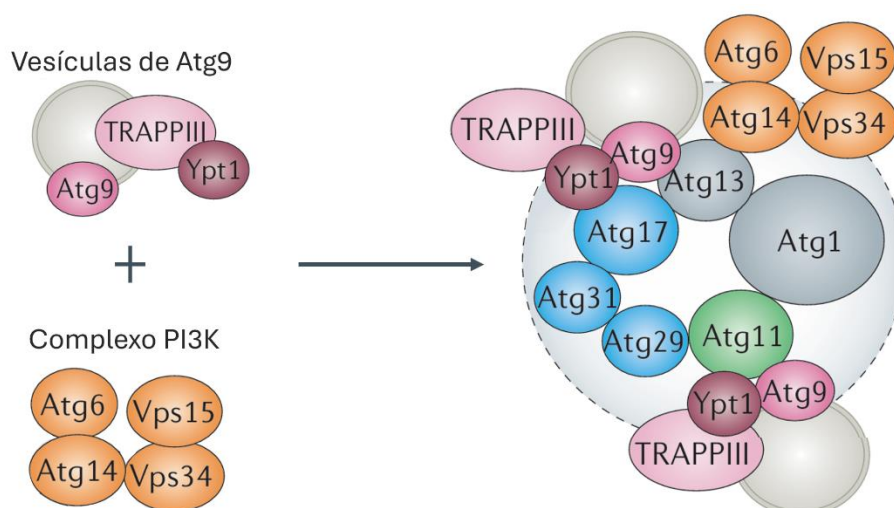


Figura 5: Recrutamento dos componentes proteicos e de membrana na etapa de nucleação. Após a formação do complexo Atg1p na região do PAS, há o recrutamento de vesículas de Atg9p e do complexo I da fosfatidilinositol-3 quinase para iniciar a etapa de nucleação (Farré *et al.*, 2016 - ADAPTADA).

Após essa etapa de iniciação da autofagia, os domínios altamente curvos formados pela interação do complexo Atg1p e as vesículas de Atg9p favorecem o recrutamento ao PAS do complexo I da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), que consiste em Vps34p, Vps15p, Vps30p/Atg6p e Atg14p; sendo a interação entre o Atg14p e componentes do complexo Atg1p responsáveis pelo seu ancoramento no PAS (**Figura 5**) (Ornatowski *et al.*, 2020). Este complexo é responsável pelo início da etapa de nucleação e pela geração de trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3), um fosfolípido

necessário para a formação do fagóforo (Pierzynowska *et al.*, 2018). O aumento da concentração desse fosfolípido no local de montagem do fagóforo irá desencadear o recrutamento de dois complexos proteicos para as etapas de expansão e maturação do fagóforo (Kitada *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018).

2.4.3. Expansão e fechamento do fagóforo

O estágio de expansão ou alongamento do fagóforo, compreendendo sua extensão até seu fechamento completo culminando na formação do autofagossomo, é mediado por meio de dois sistemas de conjugação conservados e separados e que se assemelham ao processo de ubiquitinação (Derlome-Axford *et al.*, 2015). O primeiro complexo de conjugação a ser recrutado é o Atg12p, constituído por Atg12p, Atg5p e Atg16p. Esse complexo se conecta à superfície externa do fagóforo com o intuito de estabilizar a curvatura da membrana e inibir a fusão prematura deste com vesículas ou vacúolos durante o processo de alongamento (Khandia *et al.*, 2019; Pierzynowska *et al.*, 2018).

A formação deste complexo envolve primeiramente a conjugação das proteínas Atg12p e Atg5p e requer a participação de enzimas específicas (**Figura 6**). Em um primeiro momento, a glicina C-terminal da proteína Atg12p é ativada pela enzima Atg7p (E1) por meio de uma ligação tioéster dependente de ATP (Ohsumi *et al.*, 2014). Após sua ativação, a Atg12p é transferida para a enzima Atg10p (E2), antes de finalmente formar uma ligação isopeptídica com o resíduo de lisina em Atg5 (**Figura 6**) (Chen *et al.*, 2023). O Atg5p liga-se covalentemente com a Atg16p formando assim o complexo Atg12p- Atg5p-Atg16p (Pierzynowska *et al.*, 2018).

Além do seu papel estrutural na formação da membrana do fagóforo, este complexo é responsável pelo recrutamento da proteína Atg8p e por promover a ligação entre o lipídeo fosfatidiletanolamina (PE) e a Atg8p, comportando-se como uma ligase na conjunção desse complexo (Metur *et al.*, 2023; Farré *et al.*, 2016).

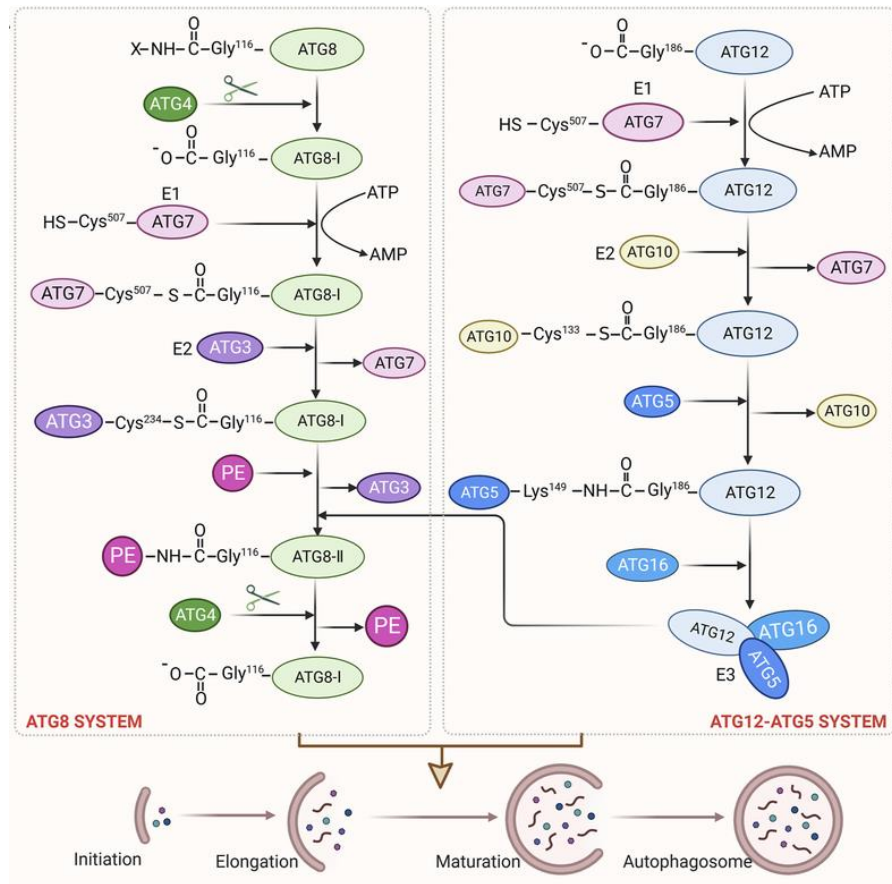


Figura 6: Esquema da formação dos sistemas de conjugação responsáveis pela expansão do fagóforo. A formação dos complexos Atg12p (Atg12p-Atg5p-Atg16p) e Atg8p-PE envolve enzimas que atuam de maneira semelhante às enzimas do processo de ubiquitinação. Uma E1 ativa a proteína com ATP, transferindo-a para a E2, que por fim a direciona para uma E3 ligase, onde é conectada a um substrato (Chen *et al.*, 2023 - ADAPTADA).

O segundo sistema de conjugação é formado pela conjugação entre a proteína Atg8p e o lipídeo fosfatidiletanolamina (PE). O complexo Atg8p-PE está presente em ambos os lados da membrana do fagóforo e é o principal responsável pela biogênese do autofagossomo, atuando na expansão da membrana do fagóforo e na formação do autofagossomo (Maruyama *et al.*, 2021).

Assim como ocorre no primeiro sistema de conjugação, a proteína Atg8p é convertida em sua forma lipídica (Atg8p-PE) após seu processamento mediado por três enzimas e o complexo Atg12p (**Figura 6**). Inicialmente a proteína Atg8p é sintetizada sob sua forma precursora contendo uma arginina C-terminal, e por isso é processada pela protease-cisteína Atg4p, que promove a clivagem no C-terminal expondo um resíduo de glicina (Metur *et al.*, 2024). Após esse processamento, as etapas assemelham-se com o primeiro sistema de conjugação a partir da ativação de

Atg8p dependente de Atg7p (E1), seguida de sua transferência para a enzima Atg3p (E2) e, por fim, a conjugação ao PE por meio de uma ligação amida (**Figura 6**) (Feng *et al.*, 2014). A conjugação de Atg8p-PE é realizada pelo complexo Atg12p que funciona como uma enzima, direcionando a ligação de PE ao resíduo de glicina de Atg8p. O complexo Atg8p-PE pode sofrer uma etapa de desconjugação por ação proteolítica da Atg4p, que cliva a ligação amida entre Atg8p e PE, liberando Atg8p da membrana e permitindo que ela retorne ao processo de conjugação (Reggiori *et al.*, 2013).

Conforme o Atg8p-PE sofre os processos descritos anteriormente, a membrana isoladora do fagóforo é expandida em volta da carga citoplasmática até que o fagóforo se sele completamente para formar uma vesícula de dupla membrana totalmente fechada, denominada de autofagossomo (**Figura 7**) (Farré *et al.*, 2016). Uma vez formado, o autofagossomo está pronto para ser transportado e se fundir ao vacúolo.

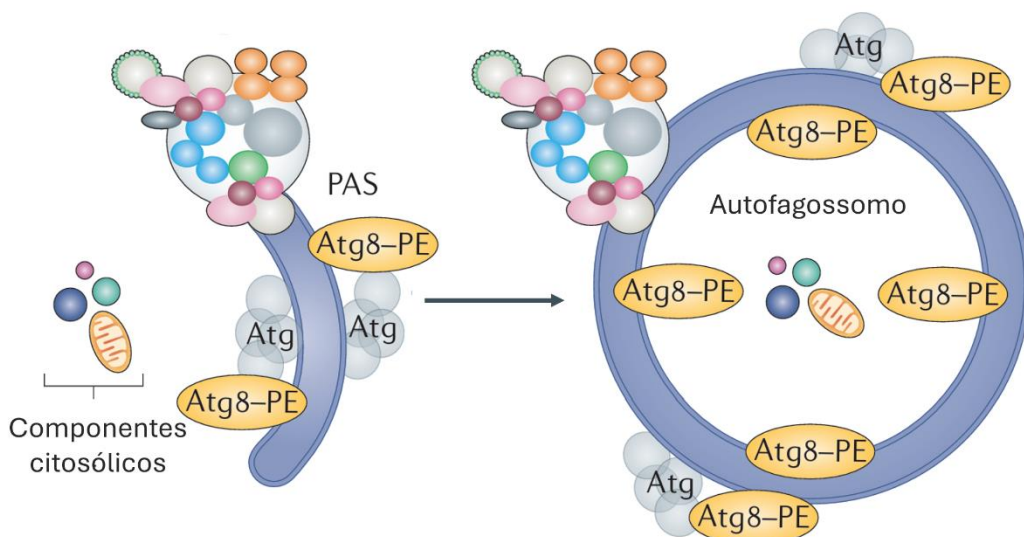


Figura 7: Expansão do fagóforo e formação do autofagossomo. Os sistemas de conjugação Atg12p e Atg8p-PE atuam na expansão da membrana do fagóforo em volta dos componentes citosólicos até que a membrana se feche, ocorrendo a formação do autofagossomo (Farré *et al.*, 2016 - ADAPTADA).

2.4.4. Fusão do autofagossomo com o vacúolo, degradação da carga autofágica e reciclagem de nutrientes

Uma vez formado, o autofagossomo intacto desloca-se em direção ao vacúolo, onde é promovida a fusão entre a membrana externa do autofagossomo com a membrana vacuolar (Farré *et al.*, 2016). Esse processo é mediado por um maquinário próprio de fusão de membranas que conta com a presença de proteínas SNAREs

(receptores de proteína de ligação do componente sensível à N-etilmaleimida solúvel), formando estruturas que se entrelaçam nas membranas e as fundem (**Figura 8**) (Yu *et al.*, 2018). Como resultado dessa fusão, a membrana interna remanescente do autofagossomo, juntamente com a carga de componentes citoplasmáticos que ela envolve, é liberada dentro do lúmen do vacúolo, tornando-se um corpo autofágico (Parzych *et al.*, 2018). A degradação inicia-se com a lise da membrana do corpo autofágico pela ação de lipases, seguida da digestão da carga autofágica por proteases e hidrolases vacuolares e, por fim, os produtos resultantes da degradação retornam ao citosol por meio de permeases para serem reutilizados em processos metabólicos (Lei *et al.*, 2022; Parzych *et al.*, 2018). Entretanto, apesar do vacúolo possuir enzimas capazes de degradar os principais tipos de macromoléculas, os canais de efluxo foram identificados apenas para aminoácidos e carboidratos. Portanto, ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais os ácidos nucleicos e os lipídios podem ser liberados do vacúolo para posteriormente serem reutilizados no citosol (Inoue *et al.*, 2010; Derlome-Axford *et al.*, 2015).

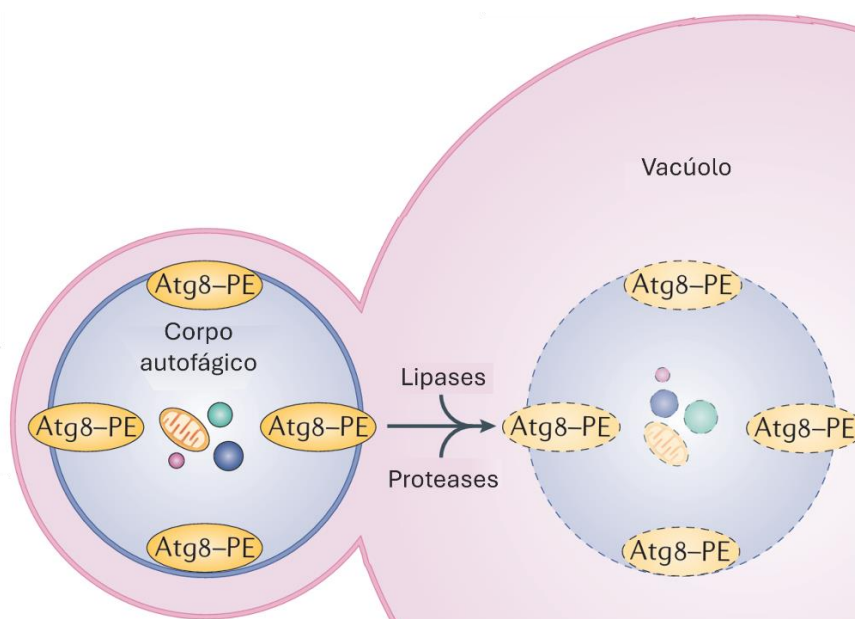


Figura 8: Fusão do autofagossomo com o vacúolo e sua degradação. Após formado, o autofagossomo é fundido ao vacúolo por intermédio de proteínas SNAREs. Dentro do lúmen do vacúolo, o corpo autofágico é degradado pela ação de lipases, hidrolases e proteases. Os aminoácidos e carboidratos gerados retornam ao citosol por meio de permeases (Farré *et al.*, 2016 - ADAPTADA).

2.5. Disfunção do processo autofágico e seu impacto na saúde

A autofagia é uma via catabólica essencial para a manutenção das funções de estruturas celulares, entretanto sua natureza complexa contendo múltiplas etapas torna-a suscetível a falhas em diferentes pontos do processo. Disfunções nessa via podem comprometer a capacidade das células em degradar componentes citoplasmáticos danificados e/ou disfuncionais, resultando no acúmulo de substâncias tóxicas, desequilíbrios metabólicos e resposta inadequada a fatores de estresse; e que consequentemente levam a disfunções em células e órgãos, contribuindo para o surgimento de patologias (Khandia *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2020; Ichimiya *et al.*, 2020).

Os distúrbios no processo autofágico podem ser categorizados como primário ou secundário. Os defeitos primários são ocasionados por alterações genéticas, como deleções gênicas, mutações ou polimorfismos, em genes que codificam proteínas pertencentes ou associadas à autofagia, resultando no funcionamento inadequado da via (Fraiberg *et al.*, 2020). Os defeitos secundários da autofagia surgem de distúrbios metabólicos normalmente associados a doenças, como o acúmulo de proteínas agregadas ou disfunção de organelas, ocasionando prejuízos na cascata autofágica (Schneider *et al.*, 2014).

Uma forma de investigar os processos envolvidos no comprometimento desta via é através do uso de organismos modelo modificados geneticamente; seja pela inserção de plasmídeos que permitem a expressão controlada de proteínas disfuncionais associadas à doenças ou à própria via autofágica; ou pelo uso direto de cepas deficientes em algum gene correlacionado a proteínas que atuam em algum ponto específico do processo autofágico que se pretende estudar (Bharadwaj *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020; Klionsky *et al.*, 2021). Por meio de pesquisas com esses organismos modelo é possível identificar a função primária de genes individuais; compreender o impacto de marcadores de doenças da via autofágica; reconhecer o efeito dessas disfunções dos genes no organismo; buscar por alvos terapêuticos para patologias associadas a esses defeitos; e compreender a ação de compostos biologicamente ativos em diferentes etapas da via autofágica (Collier *et al.*, 2021; Derlome-Axford *et al.*, 2015; Lipatova *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2014).

Portanto, nesse estudo foi priorizado o uso de três cepas gene deletadas em etapas cruciais da via autofágica, que são ausentes das proteínas Gcn4p, Atg8p e

Pep4p; e para compreender o impacto da ausência dessas proteínas no metabolismo autofágico de *S. cerevisiae*, faz-se necessária a descrição do papel de cada uma destas proteínas em etapas do processo autofágico.

2.5.1. Gcn4p: Um fator de transcrição essencial para iniciar a autofagia

Diversas proteínas estão envolvidas no processo autofágico da levedura, sejam relacionadas às cascatas de sinalização que desencadeiam a autofagia ou participando do processo de biossíntese do autofagossomo e de sua degradação, como as Atgs e as proteínas vacuolares. O zíper de leucina Gcn4p é um exemplo de proteína envolvida nas vias de sinalização do processo autofágico. Este polipeptídeo é muito conhecido por ser um regulador central do sistema de biossíntese de aminoácidos (GAAC), além de regular a expressão de genes envolvidos em várias vias que permitem a adaptação celular por meio de respostas metabólicas em condições de estresse, como a privação de nitrogênio, purinas ou glicose (Alao *et al.*, 2023; Postnikoff *et al.*, 2017).

Sob condições privativas de nitrogênio, a síntese da Gcn4p é regulada por um mecanismo de controle translacional composto pela proteína quinase Gcn2p e seu substrato conhecido como fator de iniciação 2 (eIF2). Mediante a ausência de aminoácidos, as células apresentam um acúmulo de tRNAs não carregados que possuem a capacidade de interagir com o domínio regulador de Gcn2p, ativando-a (Irniger *et al.*, 2003; Tsoi *et al.*, 2009). Uma vez ativada, a Gcn2p fosforila o eIF2 ocasionando uma redução global na tradução de mRNA, exceto para alguns mRNAs, como o de Gcn4p que é preferencialmente traduzido (Váchová *et al.*, 2024). Nessas condições, a concentração de Gcn4p no ambiente celular é aumentada e com isso é estimulada a expressão de genes que codificam enzimas de diferentes vias relacionadas à biossíntese e ao transporte de aminoácidos, à biossíntese de organelas, bem como ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e à via autofágica (**Figura 9**) (Steffen *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011; Gulias *et al.*, 2023).

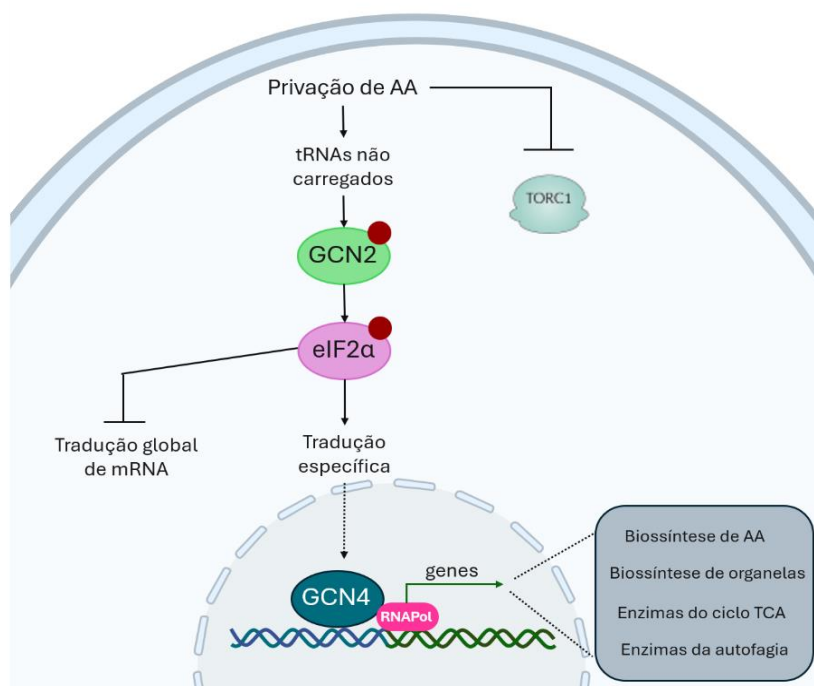


Figura 9: Esquema do controle translacional de síntese de Gcn4p. Sob condições privativas, a síntese do Gcn4p é regulada pela proteína quinase Gcn2 e seu substrato conhecido como fator de iniciação 2 (eIF2). O aumento da concentração de Gcn4p induz a expressão de genes relacionados à biossíntese de aminoácidos, proteínas do ciclo TCA e à via autofágica. Fonte: Elaborada pelo autor.

A proteína Gcn4p possui a capacidade de induzir a autofagia através da regulação transcricional de genes de proteínas ATGs relacionados às etapas iniciais da via autofágica. Durante a privação de aminoácidos, o zíper de leucina regula positivamente a expressão dos genes *ATG1*, *ATG13* e *ATG14* (Metur *et al.*, 2024; Postnikoff *et al.*, 2017). Estes genes transcrevem proteínas integrantes do complexo Atg1 (Atg1p e Atg13p) e do complexo I de fosfatidilinositol-3 quinase (Atg14p), que são essenciais para as etapas de iniciação e nucleação do fagóforo, como demonstrado na seção 2.4.2 (p. 27). Além disso, a Gcn4p pode potencializar a degradação de proteínas transportadas para o vacúolo por meio da indução da produção da aminopeptidase vacuolar (Lap4p) e da alanina-arginina aminopeptidase (AAPI) (Hinnebush *et al.*, 2002; Ecker *et al.*, 2010).

A ausência do gene *GCN4* ocasionaria a desregulação da resposta celular a estresses nutricionais, impactando na expressão de genes de diversas vias metabólicas (Gulias *et al.*, 2023). Na via autofágica, sua ausência resultaria na perda da expressão de genes de proteínas essenciais para as etapas iniciais da autofagia,

o que ocasionaria prejuízo na capacidade das células em produzir o autofagossomo em resposta à falta de aminoácidos e nitrogênio (Metur *et al.*, 2024).

2.5.2. Atg8p: Fundamental para a formação do autofagossomo

Existem diversas proteínas relacionadas à autofagia evolutivamente conservadas em eucariotos que estão envolvidas diretamente na biogênese do autofagossomo. A proteína Atg8 é a principal responsável pela expansão e formação do autofagossomo. Essa proteína hidrofílica está presente no citosol na sua forma inativa, e mediante a restrição de nutrientes é processada e recrutada para o processo autofágico (Ohsumi, 2014). O seu processamento, como detalhado na seção 2.4.3 (p. 29), culmina na ligação com o substrato lipídico fosfatidiletanolamina (PE), permitindo a formação da dupla membrana que dá origem ao autofagossomo (Maruyama *et al.*, 2021). A conjugação com o lipídeo faz com que a Atg8p seja a única proteína capaz de se ligar firmemente à membrana do autofagossomo durante sua formação até a degradação no vacúolo, possibilitando o seu uso como um bom marcador da membrana autofagossômica em ensaios de monitoramento da autofagia (Wesch *et al.*, 2020; Maruyama *et al.*, 2021).

A Atg8p modificada por lipidação (Atg8p-PE) é determinante para o bom funcionamento da via autofágica. Além de impulsionar a expansão do fagóforo, sua presença é responsável por delimitar o tamanho do autofagossomo, e interagir com proteínas de transporte e de fusão com o vacúolo; revelando-se importante para a regulação da morfologia vacuolar (Ohsumi, 2014; Liu *et al.*, 2018; Kraft *et al.*, 2024). Ademais, a Atg8p-PE também demonstrou ser fundamental na autofagia seletiva, devido a sua interação direta com os receptores seletivos de autofagia (SARs) capazes de ancorar cargas específicas, como organelas danificadas e proteínas disfuncionais, na membrana autofagossômica para sua degradação (Nieto-Torres *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2014; Farré *et al.*, 2016).

A deficiência ou inibição da expressão do gene da Atg8p pode levar ao comprometimento do processo autofágico ao impossibilitar a expansão e formação adequada das membranas do autofagossomo, originando a formação de vesículas autofágicas menores (Nieto-Torres *et al.*, 2021; Rogov *et al.*, 2014). Sua ausência compromete o sequestro seletivo de componentes citoplasmáticos específicos e a fusão vacuolar, levando a um processo autofágico ineficiente ou bloqueado. Como

consequência, há um acúmulo de material indesejado nas células e um desequilíbrio na homeostase celular (Collier *et al.*, 2021; Kraft *et al.*, 2024; Farré *et al.*, 2016).

2.5.3. Pep4p: Proteinase importante para a degradação

O vacúolo da levedura é uma organela dinâmica que abriga diversas peptidases, sendo estas as principais responsáveis pela sua função de degradação. Dentre as proteases vacuolares caracterizadas, a Pep4p, conhecida também por proteinase A, é uma aspartil endoprotease e destaca-se por ser uma “protease mestre”; uma vez que é necessária para a iniciação da cascata de ativação das demais proteases vacuolares que são conhecidas pela degradação massiva de proteínas e/ou organelas envelhecidas ou danificadas, e que foram translocadas para dentro do vacúolo por via autofágica (Kerstens *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2015).

Essas proteases, incluindo a Pep4p, são entregues ao vacúolo em suas formas precursoras inativas, denominadas zimogênios, e só serão ativadas através da remoção do peptídeo inibitório por proteólise (Hecht *et al.*, 2014). A Pep4p é capaz de sofrer autoativação dentro do vacúolo por fatores como pH ácido e alta concentração de polifosfatos e cátions divalentes. Uma vez ativa, a Pep4p inicia uma cascata proteolítica de proteases e hidrolases vacuolares por meio da promoção da clivagem direta dos resíduos peptídicos inibitórios, promovendo a maturação dessas proteases e hidrolases presentes no vacúolo (**Figura 10**) (Boutouja *et al.*, 2019). Esse processo é fundamental para a degradação dos corpos autofágicos, conforme discutido na seção 2.4.4 (p. 31).

Esta aspartil endoprotease também participa de mecanismos de respostas ao estresse celular, tanto pelo seu envolvimento na proteção contra formas proteicas perigosas e regulação de expressão gênica, quanto na morte celular programada por meio da degradação de nucleoporinas (Carmona-Gutiérrez *et al.*, 2011; Aufschnaiter *et al.*, 2017; Kerstens *et al.*, 2018). Devido a sua múltipla funcionalidade, sua deleção pode ocasionar a redução da atividade das demais proteases, gerando um aglomerado de zimogênios dentro do vacúolo, um aumento da carga autofágica de degradação e o aumento apoptótico e de necrose durante o envelhecimento cronológico das células (Lemus *et al.*, 2022; Juárez-Montiel *et al.*, 2022; Sudharshan *et al.*, 2022).

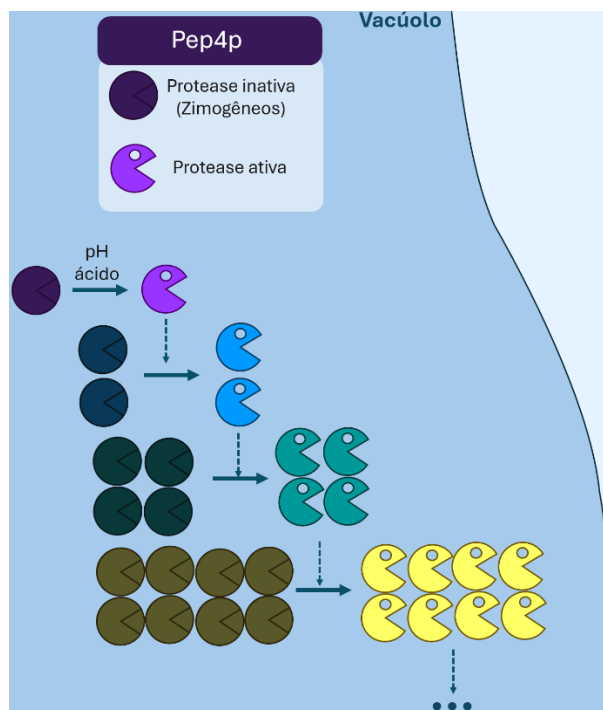


Figura 10: Esquema da cascata proteolítica de hidrolases e proteases iniciada por Pep4p. Após sofrer autoativação no vacúolo, a Pep4p promove a maturação das proteases e hidrolases por clivagem do peptídeo inibitório. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.5.4. Doenças associadas a disfunção autofágica e a busca por compostos com potencial terapêutico

Uma série de doenças têm sido relacionadas à disfunção autofágica de diversas formas. Essa relação normalmente é impulsionada por meio da identificação de defeitos genéticos em proteínas que fazem parte do funcionamento ou regulação da via autofágica, e que podem estar associadas às causas ou ao agravamento de determinadas doenças (Fraiberg *et al.*, 2020). Esses distúrbios podem afetar as mais variadas etapas do processo autofágico, desde a iniciação, passando pelo reconhecimento da carga autofágica até sua degradação final, desencadeando consequências distintas e necessitando de implicações terapêuticas.

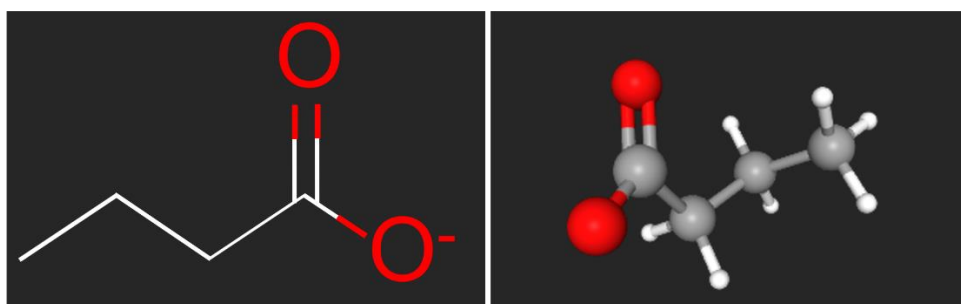
Dentre as patologias que podem ser relacionadas aos defeitos na via autofágica temos as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (Li *et al.*, 2017) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (Fraiberg *et al.*, 2020); ataxias cerebelares (Kim *et al.*, 2016); doenças neuromusculares, como a doença de Danon (Nishino *et al.*, 2000) e cardiomiopatias (Schneider *et al.*, 2014); doença de Crohn (Hampe *et al.*, 2007); lúpus eritematoso sistêmico (Meas *et al.*, 2017); síndromes metabólicas, como a diabetes (Klionsky *et al.*, 2021); e diversos tipos de carcinomas (Kim *et al.*, 2011; Liu

et al., 2013). Devido a associação da disfunção autofágica a esta vasta gama de doenças, tornou-se necessária a busca por compostos capazes de modular a autofagia, utilizando-a como estratégia terapêutica para ajudar a restaurar a homeostase celular.

Compostos biologicamente ativos presentes na dieta ou produzidos por metabolização da microbiota intestinal com potencial para regular a autofagia servem como uma estratégia para reduzir os impactos das disfunções da via. Dietas ricas em compostos fenólicos, como os flavonoides, podem induzir processos autofágicos e apoptóticos pela inibição da via TOR em modelos de camundongos, tanto em neurogliomas quanto em células de câncer colorretal; ao mesmo tempo que podem inibir o processo em modelos de glioblastomas (Lou *et al.*, 2016; Raina *et al.*, 2013; Chakrabarti *et al.*, 2016; Giampieri *et al.*, 2019). Uma dieta contendo um alto teor de carboidratos dietéticos desencadeia como consequência a geração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), por meio da fermentação bacteriana da microbiota intestinal. Esses ácidos graxos de cadeia curta apresentam uma atividade antitumoral em células de hepatomas e de câncer colorretal por intermédio da ativação da via de sinalização AMPK e da inibição da via TOR, estimulando assim a autofagia e a morte celular por apoptose (Peng *et al.*, 2009; Kaźmierczak-Siedlecka *et al.*, 2022). Dentre os ácidos graxos de cadeia curta, o butirato possui uma ampla gama de efeitos benéficos à saúde e surge como uma substância promissora para a modulação autofágica e de suporte para doenças relacionadas ao processo autofágico desregulado.

2.6. Butirato

O Butanoato, conhecido como butirato, está presente em diversos tecidos e líquidos biológicos e consiste em um ânion de ácido graxo de quatro carbonos que é base conjugada do ácido butírico, obtido pela desprotonação do grupo carboxila (**Figura 11**) (Abdel-Latif *et al.*, 2020). Este ácido graxo de cadeia curta, juntamente com o acetato e o propionato, é um metabólito primário produzido através da fermentação bacteriana anaeróbica de fibras alimentares e polissacarídeos complexos não digeridos ou parcialmente digeridos no lúmen do intestino grosso (Kaźmierczak-Siedlecka *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023).



Fórmula molecular: $C_4H_7O_2^-$ Peso molecular: 87,10 g/mol

Figura 11: Fórmula molecular, peso molecular e estrutura bidimensional e tridimensional do butirato. Na estrutura 3D, os átomos são representados nas seguintes cores: oxigênio – vermelho; carbono – cinza; e hidrogênios – branco. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butanoate>>. Acesso em: 7 mai. 2025.

Embora seja menos abundante que outros ácidos graxos de cadeia curta, o butirato têm se destacado por seus diversos efeitos fisiológicos benéficos à saúde. Este é capaz de impactar diversas vias metabólicas de diferentes tipos celulares dependendo de sua concentração no ambiente intracelular, podendo atuar como fonte de energia; regulador epigenético; regulador da função mitocondrial; sinalizador e agente protetor em células do cólon intestinal, imunes, neurônios, entre outros (Zhang *et al.*, 2016; Zaiatz-Bittencourt *et al.*, 2023; Donohoe *et al.*, 2012). Dentre os metabolismos influenciados pela ação do butirato destacam-se o metabolismo energético, metabolismo de glicose e lipídeos e a via autofágica (Clark *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Donohoe *et al.*, 2011). Devido a seus múltiplos efeitos na homeostase celular, compreender como esse ácido graxo de cadeia curta origina-se e é metabolizado pelas células é extremamente importante para o entendimento das funções regulatórias exercidas por ele e seu impacto em vias metabólicas, como a autofagia.

2.6.1. Microbiota intestinal e a biossíntese do butirato

O intestino hospeda uma complexa comunidade de microrganismos (bactérias, fungos, vírus, fagos e archaea) em simbiose com o hospedeiro, denominada microbiota (O'Riordan *et al.*, 2022). Essa microbiota desempenha funções metabólicas cruciais para a saúde, incluindo o estímulo e amadurecimento do sistema imunológico, proteção contra patógenos (Chen *et al.*, 2020; Clark *et al.*, 2017), manutenção da barreira intestinal pela produção de mucinas (Liu *et al.*, 2020; Krasinskas *et al.*, 2011)

e influência no desenvolvimento e função de órgãos distantes, como o cérebro, através de metabólitos (Colombo *et al.*, 2021; O'Riordan *et al.*, 2022). Entre as funções da microbiota intestinal, destaca-se seu papel no metabolismo energético do cólon. As enterobactérias despolimerizam carboidratos complexos não digeríveis em monossacarídeos e promovem sua fermentação, gerando produtos finais reduzidos como o butirato, que pode atuar como aceptor final de elétrons em ambientes com pouco oxigênio (Guilloteau *et al.*, 2010).

A produção de ácidos graxos de cadeia curta lineares, com destaque para o butirato, ocorre no cólon proximal pela ação de bactérias sacarolíticas dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (**Figura 12**) (Salvi *et al.*, 2021; Guilloteau *et al.*, 2010). O butirato é sintetizado a partir da associação de duas moléculas de acetil-CoA, derivado da glicólise e fermentações bacterianas, formando acetoacetil-CoA, que posteriormente é reduzido a butiril-CoA (Louis *et al.*, 2017). A conversão final de butiril-CoA em butirato se dá principalmente pela via butiril-CoA:acetato-CoA transferase, gerando butirato e acetil-CoA (**Figura 12**). Uma via alternativa é através da catálise por butirato quinase, que envolve fosfotransbutirilase e butirato quinase (Abdel-Latif *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018; Louis *et al.*, 2017; Guilloteau *et al.*, 2010).

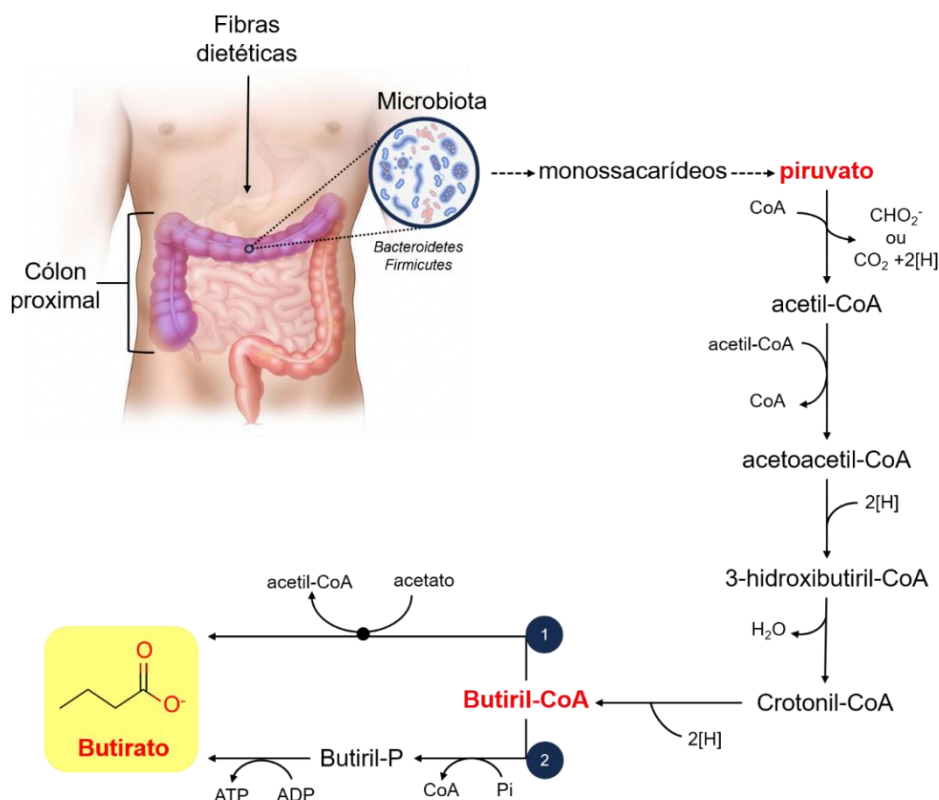


Figura 12: Biossíntese do butirato durante a fermentação bacteriana no intestino. As duas vias de produção de butirato a partir de butiril-CoA, sendo a 1 pela via fosfotransbutirilase e butirato quinase e a 2 pela via butiril-CoA:acetato-CoA transferase. Fonte: Elaborada pelo autor.

Estima-se que a concentração de ácidos graxos de cadeia curta produzidos por enterobactérias no lúmen do intestino humano varia entre 7,0 e 140mM (Sun *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Essa variação ocorre em detrimento da dieta e da composição da microbiota do hospedeiro com produção em proporções distintas, sendo 15% desse valor correspondente ao butirato (Każmierczak-Siedlecka *et al.*, 2022). No entanto, considera-se que uma parte das moléculas de butirato fique retida no muco-gel formado de mucinas produzido por células caliciformes; enquanto outra seja absorvido pelas células epiteliais do cólon intestinal, conhecidas como colonócitos, que estão mais na superfície, gerando um gradiente de concentrações de butirato ao longo do eixo lúmen-cripta (**Figura 13**) (Salvi *et al.*, 2021; Stein *et al.*, 2023). Portanto, estima-se que a concentração que chega à base das criptas varie entre 50 e 800 μM , demonstrando que a concentração de butirato dentro das células do epitélio colônicas é bem menor que a concentração de butirato presente no lúmen (Donohoe *et al.*, 2012).

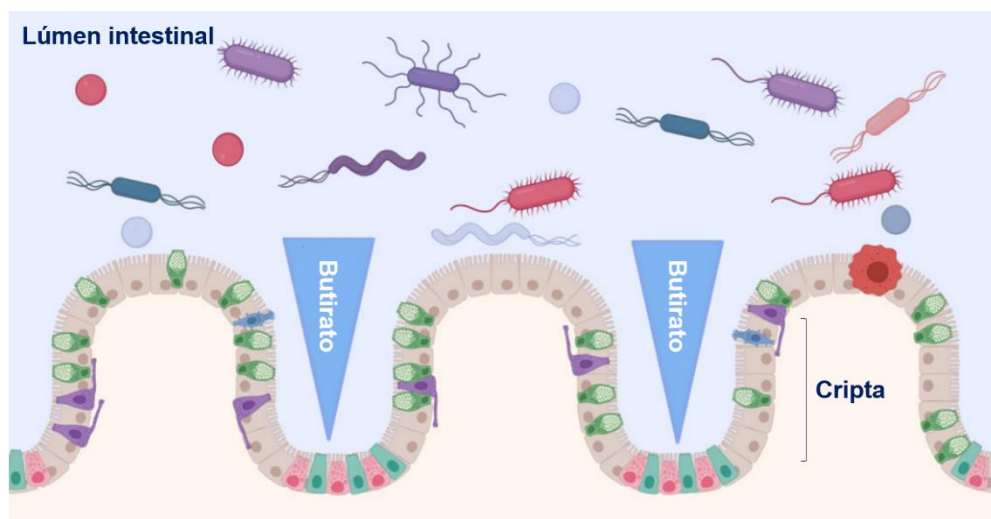


Figura 13: Gradiente de concentração decrescente de butirato do lúmen colônico para a cripta. O gradiente ocorre pela retenção da molécula no lúmen e pela sua metabolização pelos colonócitos mais próximos ao lúmen intestinal (Stein *et al.*, 2023 – ADAPTADA).

Após sua produção, o butirato é prontamente absorvido e subsequentemente metabolizado pelos colonócitos, onde desempenha a função de principal substrato energético (Salvi *et al.*, 2021). Por conta dessa metabolização, uma menor quantidade atinge a circulação geral, sendo mais alta na circulação portal e mais baixa na circulação periférica, onde pode chegar a $4,0\mu\text{mol/L}$ (O’Riordan *et al.*, 2022). Sua concentração fisiológica em tecidos cerebrais é de $17,0\text{pmol/mg}$ e no líquido cefalorraquidiano é estimado em uma concentração máxima de $2,8\mu\text{M}$ (Silva *et al.*, 2020). Apesar de sua baixa concentração no sistema nervoso central, o butirato demonstra significativas propriedades neuroativas. Nesse contexto, a disbiose da microbiota intestinal, ao acarretar a redução na produção desse composto, pode estar implicada na exacerbação de doenças neurodegenerativas, a exemplo da doença de Parkinson e da doença de Alzheimer. Em contrapartida, o aumento nos níveis de butirato emerge como uma potencial estratégia para a atenuação dessas condições patológicas (Hill *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Embora muitos estudos empreguem concentrações suprafisiológicas de butirato, seja para mimetizar as elevadas concentrações luminais intestinais ou para saturar as vias metabólicas e assim destacar seus efeitos em determinados processos *in vitro*, tais níveis não refletem as concentrações fisiologicamente encontradas no organismo (Stein *et al.*, 2023). A utilização de baixas concentrações de butirato, além de reproduzir os níveis fisiológicos, pode elucidar mecanismos moleculares distintos

daqueles observados em doses elevadas. Tais concentrações fisiológicas podem induzir efeitos como a proliferação celular, autofagia e citoproteção, representando assim um campo promissor para estudos com potenciais aplicações terapêuticas (Zhang *et al.*, 2016; Guilloteau *et al.*, 2010; Salimi *et al.*, 2017).

2.7. Metabolização do butirato

O butirato é capaz de interferir em diversos metabolismos celulares e sistêmicos dependendo do tipo celular e da concentração utilizada. Esse ácido graxo de cadeia curta pode exercer influências sobre o metabolismo celular através de dois mecanismos conservados em eucariotos: por ativação dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs); e através do transporte para o interior celular por transportadores de monocarboxilato, onde exerce múltiplos efeitos intracelulares (**Figura 14**) (Pérez-Escuredo *et al.*, 2016).

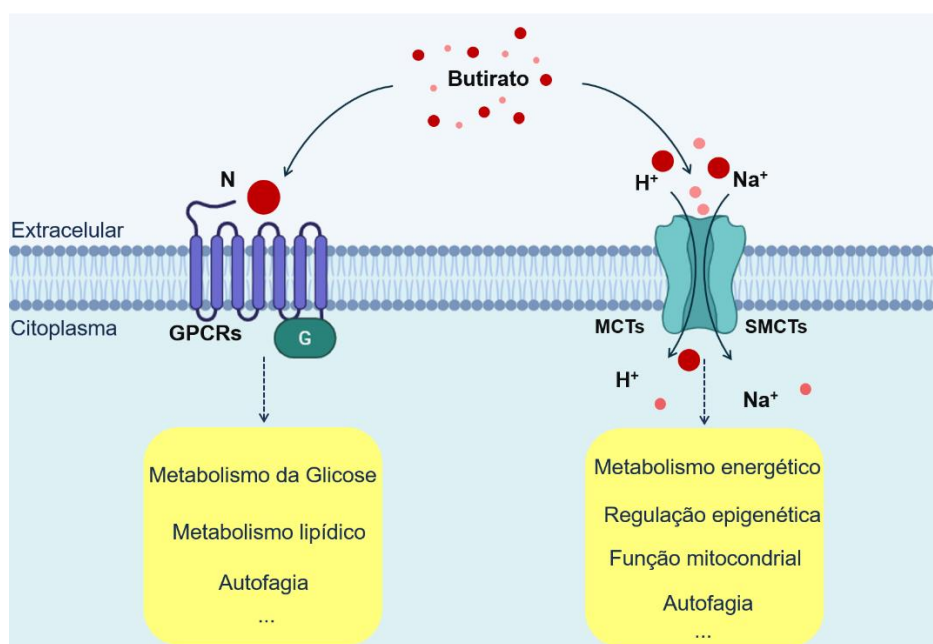


Figura 14: A interferência do butirato no metabolismo celular pela interação com os GPCRs ou por transportadores monocarboxilatos. O butirato extracelular pode ativar os GPCRs ou pode adentrar no ambiente intracelular através dos transportadores de monocarboxilatos. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são uma grande família de proteínas transmembrana essenciais para a comunicação celular, atuando como sensores na superfície da célula que reconhecem diversas moléculas bioativas extracelulares (de Mendoza *et al.*, 2014). Ao se ligarem a esses ligantes,

desencadeiam cascatas de sinalização intracelular permitindo respostas celulares rápidas a estímulos externos (Öz-Arslan *et al.*, 2024). Essa família de receptores é amplamente distribuída em eucariotos com diversos tipos em tecidos de mamíferos, como Gpr41p e Gpr43p, sensíveis a ácidos graxos de cadeia curta (Park *et al.*, 2021; Carretta *et al.*, 2021). Leveduras possuem um número menor de GPCRs, incluindo Ste2p, Ste3p (para feromônios) e Gpr1p (detecção de açúcares), sendo este último o mais provável de interagir com o butirato (Wang *et al.*, 2020; Lengger *et al.*, 2020; McCrory *et al.*, 2024).

A ativação dos receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs) pelo butirato ocorre através da ligação desta molécula à região N-terminal extracelular desses receptores (**Figura 14**) (Melhem *et al.*, 2019). Essa interação butirato-GPCR induz uma mudança na conformação da proteína de membrana, possibilitando a ativação da proteína G intracelular (Weis *et al.*, 2018). Uma vez ativada, a proteína G desencadeia cascatas de sinalização intracelular capazes de impactar diversas vias metabólicas, incluindo metabolismos de lipídeo e glicose, e a modulação na via autofágica (Öz-Arslan *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2018).

Além de interagir com GPCRs, o butirato é transportado para o interior celular por transportadores de monocarboxilato (MCTs), uma família de proteínas transmembrana que cotransportam moléculas orgânicas contendo um único grupo carboxila (monocarboxilato) juntamente com um próton (H^+) para o interior celular (**Figura 14**) (Iacono *et al.*, 2007). Essenciais para a homeostase e altamente conservados em eucariotos, os MCTs transportam metabólitos como lactato, piruvato e outros ácidos graxos (Pérez-Escuredo *et al.*, 2016). Eles se dividem com base na espécie iônica cotransportada com o monocarboxilato: em MCTs clássicos (cotransporte com H^+) e SMCTs (cotransporte com sódio para sais de monocarboxilatos) (Wei *et al.*, 2023; Vijai *et al.*, 2014).

O butirato, um ácido graxo de cadeia curta classificado como monocarboxilato, possui a característica de apresentar-se em duas formas distintas, dependendo do pH do meio circundante. Em condições de pH fisiológico, o butirato encontra-se majoritariamente na sua forma ionizada (ânion butirato), geralmente associado a cátions como o sódio, favorecendo o seu transporte para o interior celular através de SMCTs (Salvi *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2018). Entretanto, em ambientes de pH mais ácidos ($pH < 4,8$), a forma protonada do butirato, conhecida como ácido butírico, torna-

se mais abundante, sendo o transporte celular mediado principalmente por transportadores acoplados a prótons (MCTs) (**Figura 14**) (Portincasa *et al.*, 2022; Salvi *et al.*, 2021). O mecanismo de transporte de butirato mediado por essas proteínas transmembranais ocorre através de cotransporte, no qual a molécula de butirato é transportado simultaneamente com prótons ou íons sódio por meio da membrana celular (Mayorga-Ramos *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2018). Esse processo explora o gradiente eletroquímico preexistente desses íons, com maior concentração no meio extracelular, para impulsionar a entrada do butirato para o citoplasma (**Figura 14**) (Portincasa *et al.*, 2022).

Uma vez internalizado pelas células, o butirato demonstra versatilidade funcional, podendo ser empregado como substrato energético via β -oxidação (Clark *et al.*, 2017); exercer um papel de modulador epigenético ao influenciar na modulação da acetilação de histonas (Hatayama *et al.*, 2007; Donohe *et al.*, 2012); e regular importantes vias de sinalização intracelular, a exemplo da AMPK e da TOR, as quais desempenham funções essenciais no controle de processos celulares fundamentais como a autofagia (Zhou *et al.*, 2021; Pant *et al.*, 2017).

2.7.1. Regulação epigenética impulsionada pelo butirato

A regulação da expressão gênica em eucariotos depende da dinâmica estrutural do nucleossomo, controlada por diversas proteínas (Hatayama *et al.*, 2007). Um mecanismo chave é a acetilação e desacetilação de histonas, reguladas pela enzima histona acetiltransferase (HAT) e pela histona desacetilase (HDAC). A acetilação das histonas catalisada pela HAT relaxa a cromatina facilitando a transcrição gênica, enquanto a desacetilação pela HDAC compacta a cromatina, geralmente reprimindo a expressão gênica (Adom *et al.*, 2013; Gerhauser, 2018).

O butirato exerce influência no metabolismo celular ao induzir a hiperacetilação de histonas. Este ácido graxo de cadeia curta promove o aumento da acetilação de histonas por duas vias distintas, sendo o mecanismo predominante dependente de sua concentração no citoplasma. Em baixas concentrações, o butirato é metabolizado através da β -oxidação, seguido pela etapa inicial do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), resultando na formação de citrato. Esse citrato é então transportado para o citoplasma, e a enzima ATP-citrato liase (ACL) o converte em acetil-CoA. O aumento na concentração de acetil-CoA estimula a atividade das histonas acetiltransferases

(HAT), levando a hiperacetilação das histonas (**Figura 15**) (Donohoe *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2017). Em contraste, concentrações mais elevadas de butirato, que excedem a capacidade metabólica do ciclo do TCA, causam o acúmulo do ácido graxo no núcleo. Nesse compartimento o butirato interage diretamente com as histonas desacetilases (HDACs), inibindo sua atividade e, consequentemente, resultando também em um aumento global da acetilação de histonas (**Figura 15**) (Gerhauser, 2018).

Apesar de ambas as concentrações de butirato levarem à hiperacetilação de histonas, este fato impacta de forma diferente nas regiões do genoma e, consequentemente, induzem padrões distintos de expressão gênica. Enquanto concentrações baixas de butirato tipicamente favorecem a ativação de genes envolvidos na proliferação celular, concentrações elevadas frequentemente resultam na supressão da proliferação e no desencadeamento do apoptose (Liu *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Salimi *et al.*, 2017).

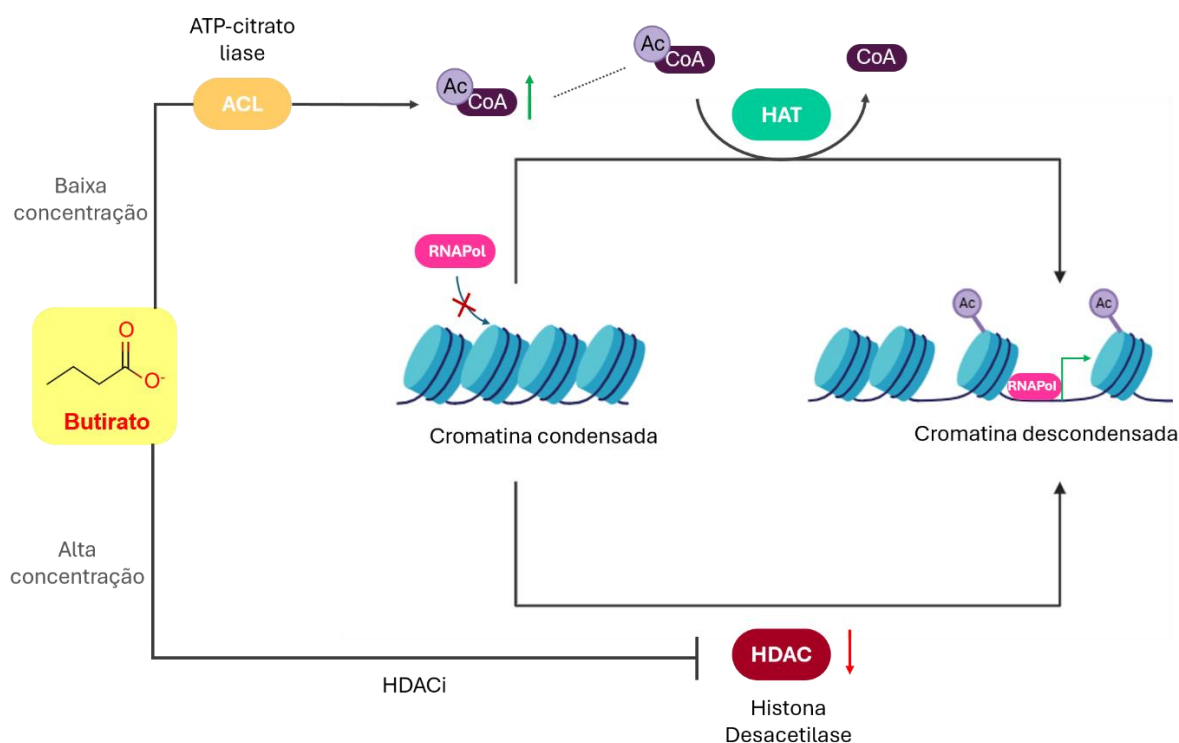


Figura 15: Vias de regulação da acetilação das histonas pelo butirato em diferentes concentrações. Em baixas concentrações, o butirato é metabolizado elevando a concentração de acetil-CoA, que ativa a HAT e promove a acetilação de histonas. Em altas concentrações, o butirato inibe a HDAC, enzima que remove grupos acetil das histonas, também resultando em maior acetilação. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.7.2. β -oxidação do butirato: uma fonte de energia celular

A β -oxidação é uma via catabólica complexa que promove a degradação de ácidos graxos. O termo " β -oxidação" refere-se à oxidação do carbono β em relação ao grupo carboxílico do ácido graxo. Em eucariotos, a β -oxidação degrada ácidos graxos em quatro etapas sequenciais, tanto em mitocôndrias quanto em peroxissomos, removendo unidades de dois carbonos sob a forma de acetil-CoA (Vasiljevski *et al.*, 2018). Este acetil-CoA segue para o ciclo do TCA, onde gera ATP tornando a β -oxidação uma via essencial para a produção de energia celular (Houten *et al.*, 2016).

O butirato, sendo um ácido graxo de cadeia curta, pode ser metabolizado via da β -oxidação dentro das mitocôndrias ou peroxissomos. Apesar de um mecanismo básico similar compartilhado, as organelas diferem em detalhes, como as enzimas específicas, produtos finais e objetivos metabólicos (Demarquoy *et al.*, 2015; Fransen *et al.*, 2017). Uma vez no interior da matriz mitocondrial ou peroxissomal, o butirato é ativado pela acil-CoA sintase, que utiliza a energia do ATP para acoplar o ácido graxo à coenzima A (CoASH), formando butiril-CoA (**Figura 16**) (Sandhir, 1999). Esse butiril-CoA sofre β -oxidação, sendo quebrado em duas moléculas de acetil-CoA.

A β -oxidação do butirato começa com a remoção de hidrogênios do butiril-CoA, catalisada por acil-CoA desidrogenase (mitocôndria) ou acil-CoA oxidase (peroxissomo) (Corthals *et al.*, 2011). Essa desidrogenação cria uma dupla ligação entre os carbonos α e β , liberando elétrons que reduzem a coenzima flavina adenina dinucleotídeo FAD a FADH_2 (Vasiljevski *et al.*, 2018). Na mitocôndria, o FADH_2 alimenta a cadeia respiratória para produzir ATP (Feher, 2012). Nos peroxissomos, o FADH_2 doa elétrons diretamente ao oxigênio, formando H_2O_2 , que é então neutralizado pela catalase (Demarquoy *et al.*, 2015).

A β -oxidação prossegue com a adição de uma molécula de água (H_2O) à ligação dupla (formada na etapa anterior) entre os carbonos α e β , gerando 3-hidroxibutiril-CoA. Essa hidratação ocorre tanto na mitocôndria quanto no peroxissomo, mas com enzimas diferentes. A terceira etapa é uma segunda desidrogenação, removendo átomos de hidrogênios do 3-hidroxibutiril-CoA para formar 3-cetobutiril-CoA (**Figura 16**) (Le Borgne *et al.*, 2012). Novamente, enzimas específicas atuam em cada organela, transferindo os hidrogênios para NAD^+ , produzindo NADH. Na mitocôndria, o NADH doa elétrons à cadeia respiratória para

gerar ATP (Corthals *et al.*, 2011). A etapa final é a clivagem tiolítica, catalisada pela tiolase, que quebra a ligação entre os carbonos α e β do 3-cetobutiril-CoA e adiciona CoASH, liberando duas moléculas de acetil-CoA (Demarquoy *et al.*, 2015). Esse acetil-CoA pode entrar no ciclo do TCA na mitocôndria para gerar CO_2 ou ser liberado no citosol.

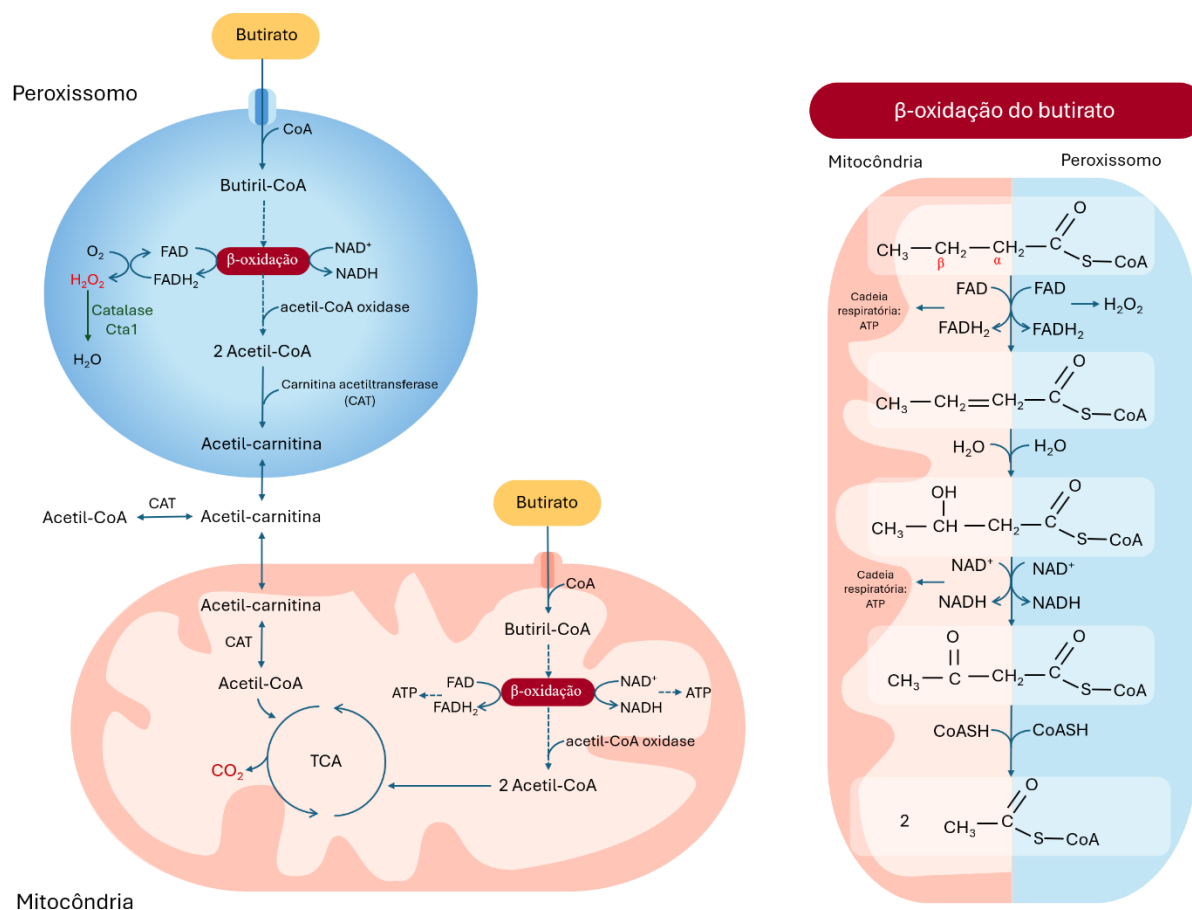


Figura 16: Esquema da β -oxidação do butirato no peroxissomo e na mitocôndria. A β -oxidação do butirato, que ocorre tanto em peroxissomos quanto em mitocôndrias seguindo quatro passos (desidrogenação com FAD, hidratação, segunda desidrogenação e clivagem com CoA), gera duas moléculas de acetil-CoA. Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção de ATP, resultante da beta-oxidação do butirato possui a capacidade de modular importantes vias de sinalização celular, como a via AMPK. Essa modulação permite o controle preciso de processos metabólicos relacionados à energia e também da via autofágica (Pant *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020).

2.8. Butirato e a autofagia

Em diversos estudos com células o butirato destaca-se como um potencial ativador da autofagia (Tang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012). Essa

capacidade de induzir a autofagia manifesta-se através do aumento da síntese de proteínas cruciais para a formação do autofagossomo, como Atg8p e Atg5p (Li *et al.*, 2022; Pant *et al.*, 2017). Os múltiplos mecanismos pelos quais o butirato influencia a autofagia frequentemente convergem na inibição do complexo TORC1p, como demonstrado nas vias de sinalização AMPK e PI3K/Akt/TOR.

A proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase bioenergética celular, atuando como um sensor sensível às variações nos níveis de ATP intracelular (Tang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2022). Geralmente, a AMPK é ativada por fosforilação em resposta a um desequilíbrio na razão AMP/ATP dentro da célula (Stein *et al.*, 2000). Além disso, outros distúrbios metabólicos, como o estresse oxidativo e a privação de glicose (estresse nutricional), também podem desencadear sua ativação (Hardie *et al.*, 2012). Uma vez ativada, a AMPK pode iniciar uma série de eventos de sinalização dentro da célula, sendo notável sua capacidade de promover a autofagia por meio de dois mecanismos principais: a inibição do complexo TORC1p e a fosforilação e ativação do complexo Atg1p (**Figura 17**) (Wang *et al.*, 2022; Johnson *et al.*, 2013).

O butirato é reconhecido como um ativador da AMPK e pode induzir sua fosforilação por meio de diferentes mecanismos. Inicialmente, sua oxidação pode elevar os níveis de ATP seguida por uma queda, gerando um desequilíbrio na razão AMP/ATP que ativa a AMPK (Clark *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2023). Além disso, o butirato pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares, que em altas concentrações podem levar à inibição da síntese de ATP mitocondrial, com consequentes aumentos nos níveis de AMP e ADP e assim ativando a AMPK (Hardie *et al.*, 2012). Independentemente do mecanismo de ativação, a AMPK ativada invariavelmente leva à inibição do complexo TORC1p, resultando na indução da autofagia, como mencionado anteriormente na descrição das etapas do mecanismo autofágico.

Outra via de sinalização influenciada pela ação do butirato é a via PI3K/Akt/TOR. Esta via possui um papel crucial na regulação do crescimento celular em resposta à disponibilidade de nutrientes (Pant *et al.*, 2017; Giannattasio *et al.*, 2013). Ativada por receptores acoplados à proteína G (GPCRs) em condições nutricionais favoráveis, a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) converte fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), induzindo a

fosforilação da Aktp, resultando na ativação do complexo TORC1p e consequente inibição da autofagia (**Figura 17**) (Öz-Arslan *et al.*, 2024; Iksen *et al.*, 2021; Chalhoub *et al.*, 2009). A inibição dessa via, por outro lado, está ligada à indução da autofagia (Zhou *et al.*, 2021).

O butirato demonstra a capacidade de impulsionar o processo de autofagia através da inibição do complexo TOR por meio da supressão da via de sinalização PI3K/Akt/TOR (Huang *et al.*, 2019). Esse comportamento está associado a indução do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular ocasionado pelo butirato em determinados tipos celulares (Ding *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2023). Em concentrações elevadas, essas espécies reativas de oxigênio podem interferir negativamente no processo de fosforilação e, consequentemente, na ativação da proteína quinase Aktp (também conhecida como proteína quinase B), um componente chave da via PI3K/Akt/mTOR (Pant *et al.*, 2017). A inativação da Aktp desativa a sinalização a jusante para o complexo TOR, o que possibilita o início do processo autofágico (Zhou *et al.*, 2021). Embora na literatura exista uma associação entre o butirato e modulação dos níveis de EROs nas células, o mecanismo molecular preciso pelo qual o butirato induz essa variação nos níveis de espécies reativas de oxigênio ainda não está completamente esclarecido.

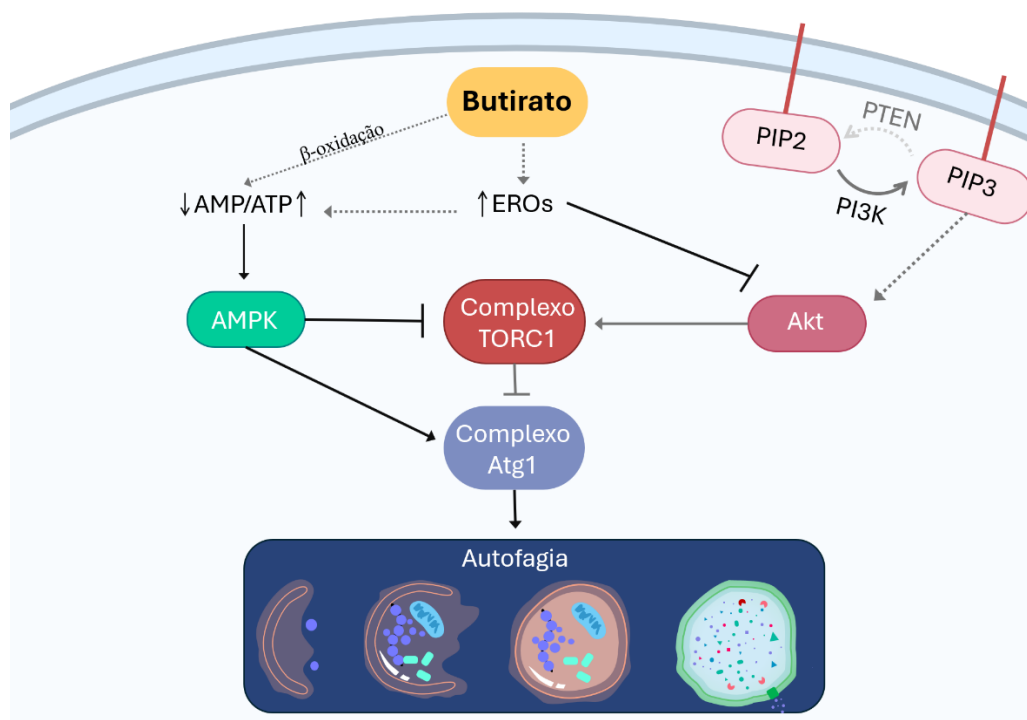


Figura 17: O butirato influencia a autofagia através da modulação das vias PI3K/Akt/TOR e AMPK. A ativação da AMPK por desequilíbrio energético (via β -oxidação do butirato) ou pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) inibe TORC1p e ativa Atg1p, iniciando a autofagia. Paralelamente, o butirato pode aumentar EROs, inibindo a Aktp, o que também inativa TORC1p e promove a autofagia. Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora o butirato seja reconhecido por ativar vias de sinalização que levam à autofagia, seus efeitos em baixas concentrações sobre esse processo ainda não são completamente compreendidos (Donohoe *et al.*, 2012). Diante dessa lacuna, torna-se essencial investigar como o butirato de sódio influencia etapas cruciais da autofagia, como a regulação gênica, a formação do autofagossomo e a degradação vacuolar. Este estudo propõe-se a examinar a ação do butirato em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com genes específicos deletados em 3 cepas ($\Delta atg8$, $\Delta pep4$ e $\Delta gcn4$), buscando estabelecer uma possível correlação entre a resposta autofágica induzida pelo butirato e a função dessas proteínas durante a metabolização desse ácido graxo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a influência do butirato em baixas concentrações nas diferentes etapas do processo autofágico em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar as concentrações não citotóxicas de butirato em células de *S. cerevisiae*;
- 2) Investigar a influência do butirato nos mecanismos autofágicos relacionados às proteínas Gcn4p, Atg8p e Pep4p;
- 3) Estabelecer o efeito do butirato sobre a funcionalidade mitocondrial nas cepas $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$;
- 4) Relacionar a ação biológica do butirato com os níveis de oxidação intracelular nas cepas $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$.

4. MATERIAIS E METODOLOGIAS

4.1. Materiais

4.1.1. Preparo da solução de Butirato de sódio

O butirato de sódio (B) foi adquirido pela Sigma-Aldrich Chemie (Brasil). Para o preparo da solução estoque de butirato de sódio na concentração de 20,0 mM pesou-se 0,0220 g deste sólido e solubilizou-se em 10 mL de água destilada estéril. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 1,0 mL que foi adicionada à 9,0 mL de água estéril para a geração da solução final de butirato de sódio a 2,0 mM utilizada nos experimentos diários.

4.1.2. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Nesse estudo foram utilizadas quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A cepa utilizada como controle foi a BY4741 (genótipo: *Mata*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*). As cepas mutantes isogênicas de BY4741 empregadas no estudo foram $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$. A cepa BY4741 foi obtida pela companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), com sede em Frankfurt (Alemanha), enquanto as cepas mutantes deficientes nos genes *ATG8*, *GCN4* e *PEP4* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claudio Akio Masuda (UFRJ). Todas as cepas foram armazenadas em meio YPD 2 % sólido e conservadas sob refrigeração (4 °C).

4.1.3. Meios de cultivo

Para os experimentos *in vivo* propostos foram utilizados os seguintes meios de cultura: o meio YPD 2 % composto por 1 % de extrato de levedura (Difco, EUA), 2 % de peptona (Difco, EUA) e 2 % de glicose (Vetec, Brasil); o meio YPD 2 % sólido constituído por 1 % de extrato de levedura (Difco, EUA), 2 % de peptona (Difco, EUA); 2 % de glicose (Vetec, Brasil) e 2 % de ágar (Himedia, Índia); o meio SD composto por 2 % de glicose, 0,67 % de base nitrogenada de levedura (Difco, EUA) sem suplementação de aminoácidos e 0,2 % de dropout de aminoácidos; e o meio de privação de nitrogênio SD-N composto por 2 % de glicose e 0,17 % de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio (Difco, EUA). Tais meios de cultivo juntamente com os materiais de manipulação celular foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C a 1 atm por 15 minutos.

4.2. Metodologias

4.2.1. Condições de cultivo

Em uma cabine de fluxo laminar vertical com filtro HEPA (Marca ESCO®), iniciou-se o cultivo celular a partir do preparo de um repique, que consiste na transferência da cultura estoque de levedura auxiliada por alça de inoculação (LOOPS) para um tubo *viale* contendo meio YPD 2 % sólido inclinado. Este foi submetido a uma incubação a 28 °C por 24 h em uma estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®).

Para o preparo dos inóculos calculados, uma pequena amostra celular foi transferida por meio de uma alça de inóculo (LOOPS) para um tubo tipo falcon contendo 10 mL de água destilada estéril. O volume necessário para inocular cerca de 4 µg de suspensão celular foi obtido através do cálculo para encontrar a concentração celular a partir da medida da absorbância (570 nm) em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro®). Com o volume determinado, uma alíquota correspondente a 4 µg foi inoculada em um erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio YPD 2 %. Para cada cepa houve o preparo de um inóculo correspondente.

Os inóculos foram incubados em uma incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA®) a 160 rpm/28 °C por 22 h. Após esse período, a concentração celular do inóculo foi determinada através da medida da absorbância (570 nm) em espectrofotômetro por meio da conversão de suspensão celular em massa celular (mg de peso seco de células/mL de meio de cultura). A suspensão celular foi recolhida para os experimentos em primeira fase do crescimento exponencial (fermentativa), que corresponde à faixa de concentração entre 0,6 mg/mL e 1,2 mg/mL.

4.2.2. Curva de crescimento

Após 22 h de crescimento celular a concentração da suspensão de células foi determinada, e uma alíquota contendo uma massa correspondente a 1 mg de células foi transferida para erlenmeyers (50 mL) com 10 mL de meio YPD 2 %, gerando inóculos cuja concentração inicial corresponde a 0,1 mg/mL. A estes inóculos contendo a cepa controle foram adicionados diferentes volumes da solução de butirato de sódio (2 mM), a fim de que tivéssemos concentrações de 0 µM, 50 µM, 100 µM,

150 μM e 200 μM ; e em seguida as suspensões celulares foram incubadas em uma incubadora tipo shaker a 160 rpm/28 °C por 24 h para a verificação da citotoxicidade do butirato. Para a construção da curva de crescimento, uma alíquota de cada inóculo foi retirada nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 22 e 24 horas para a leitura da turbidez com o auxílio de um espectrofotômetro na densidade óptica de 570 nm. A concentração das suspensões celulares foi determinada multiplicando-se a absorbância lida pelo fator de diluição e pelo fator óptico do próprio espectrofotômetro.

4.2.3. Cálculo da taxa de crescimento celular máxima ($\mu_{\text{máx}}$)

A taxa de crescimento celular máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida a partir do monitoramento da variação da concentração das suspensões celulares de BY4741 tratadas com butirato (0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM) durante 24 h, conforme o ensaio de curvas de crescimento celular previamente descrito. A concentração foi aferida pela densidade óptica a 570 nm (DO_{570}). A taxa de crescimento específica ($\mu_{\text{máx}}$) foi então calculada utilizando a seguinte equação:

Equação 1: Equação para o cálculo da taxa de crescimento.

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

Onde X corresponde à concentração celular no instante t, X_0 é a concentração celular inicial, e o $\mu_{\text{máx}}$ é a taxa de crescimento específica, como demonstrado no gráfico abaixo (Do Nascimento *et al.*, 2018) (**Figura 18**). A taxa de crescimento específica foi calculada para a fase exponencial da curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

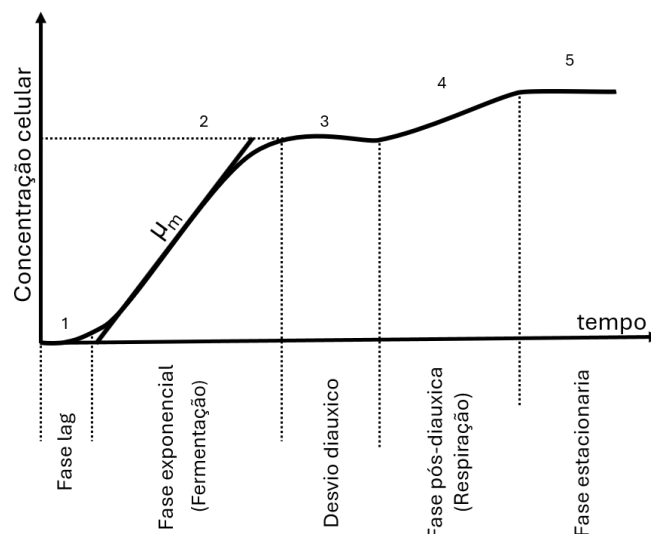


Figura 18: Determinação da taxa de crescimento celular específica (μ) a partir da curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. A curva de crescimento da levedura pode ser dividida em 5 partes: fase lag, fase exponencial (fermentação), desvio diáuxico, fase pós-diáuxica (respiração) e fase estacionária. A taxa é calculada na fase exponencial. Fonte: Elaborada pelo autor com base em (Pires, 2017).

4.2.4. Viabilidade celular da curva de crescimento

Para monitorar a citotoxicidade a partir das concentrações de butirato de sódio utilizadas na construção da curva de crescimento, avaliou-se a possibilidade de formação de colônias. Para isso, retirou-se alíquotas de suspensão celular com massa correspondente a 40 μ g nos tempos de 2, 6 e 24 horas. Em seguida, essas alíquotas foram submetidas a uma diluição seriada em água destilada estéril. Ao final dessa diluição, uma massa de aproximadamente 0,04 μ g de suspensão celular foi inoculada em placas de Petri contendo meio YPD 2 % sólido, utilizando-se uma alça de Drigalski para o espalhamento. Essas placas foram então incubadas em uma estufa incubadora refrigerada à 28 °C e as colônias contabilizadas após três dias. Cada resultado individual foi obtido em experimentos com duplicata.

4.2.5. Ensaio de viabilidade com resazurina

O protocolo descrito por Fai *et al.* (2009) foi utilizado como base para o experimento. Inóculos das cepas BY4741, $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ foram feitos conforme descrito anteriormente. Retirou-se uma alíquota da suspensão celular correspondente a 10 mg de células, centrifugou-se (6000 rpm/5 min), desprezou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com água destilada estéril. Em seguida, as

células foram ressuspensas em solução tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0), e separadas em células que seriam expostas à solução de butirato de sódio com concentração de 100 μ M em contato com a suspensão celular, e células que não passariam por esse tratamento utilizadas como parâmetro para controle. Após 24 h sob agitação em uma incubadora tipo shaker à 160 rpm/28 °C, as suspensões celulares foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água deionizada e ressuspensas em solução tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4), previamente preparada em água deionizada. Dessa suspensão, uma alíquota correspondente a 1,5 mg das células foi transferida para uma placa de 96 poços preta em triplicata, adicionou-se aos poços uma solução do reagente sal sódico 7-hidróxi-3*H*-fenoxazin-3-ona-10-óxido, conhecido como resazurina, à 12,5 μ M de concentração em solução tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). O ensaio baseia-se na reação redox do corante não tóxico resazurina (azul – baixa fluorescência) que é reduzido a resorufina (rosa – alta fluorescência) pela ação de enzimas redutases presentes no metabolismo celular através da geração de poder redutor intracelular (**Figura 19**).

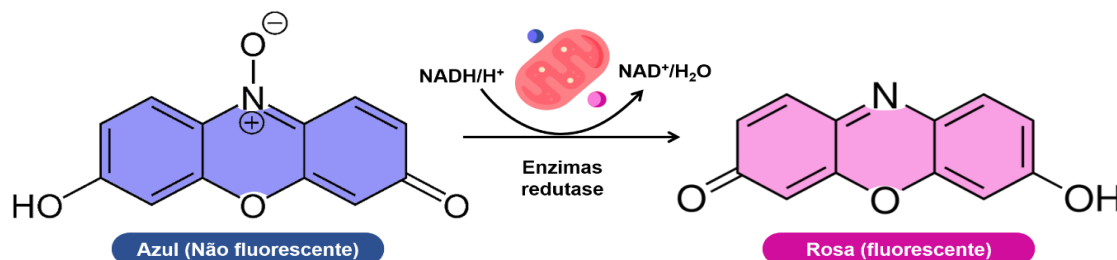


Figura 19: Princípio do ensaio da resazurina. Redução da resazurina (azul) a resorufina (rosa) frente a ação do metabolismo celular ativo.

As células expostas ao reagente resazurina foram incubadas durante 40 minutos, e após esse período realizou-se a quantificação da fluorescência através de um leitor de microplacas CHAMELEON V (HidexOy[®]), onde utilizou-se um conjunto de filtro de lentes correspondente aos comprimentos de onda de 534 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A quantificação é baseada na promoção de incidência de luz de excitação sobre os poços contendo as amostras e na luz de emissão detectada pelos filtros do aparelho. Os dados coletados foram expressos em porcentagem relativos ao controle (BY4741) com o intuito de se obter uma clara compreensão dos resultados.

4.2.6. Viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio

O ensaio de indução autofágica por privação de nitrogênio realizado nesse estudo adaptou-se ao protocolo proposto por George *et al.* (2000). Após o crescimento celular por 22 h, foram retiradas alíquotas das suspensões celulares de BY4741, $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ correspondentes a 10 mg de células. Estas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, as células lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em 10 mL de meio indutivo de autofagia por privação de nitrogênio (SD-N) e em meio em condições nutricionais sem restrições (SD), a fim de obter uma concentração final correspondente a 1,0 mg/mL. As culturas foram divididas em células sem tratamento para termos um controle frente às células tratadas com 100 μ M de solução de butirato de sódio. O tratamento foi realizado simultaneamente à exposição aos meios SD e SD-N. As suspensões foram incubadas em uma incubadora tipo shaker a 160 rpm/28 °C durante 4 h e 24 h. Após esses períodos as amostras de cada cultura foram plaqueadas em meio YPD 2 % sólido, conforme descrito anteriormente e em duplicata, e as colônias contabilizadas após três dias em estufa incubadora refrigerada à 28 °C.

4.2.7. Quantificação de colônias *petite*

Após o plaqueamento realizado no ensaio de viabilidade autofágica, a detecção e quantificação das mutantes “*petite*” foi realizada a partir da observação da variação de tamanho das colônias. As células das colônias *petite* são menores do que as das colônias padrão observadas nas placas da cepa controle, possibilitando a distinção entre estas. A partir do 5º dia de plaqueamento, as placas foram fotografadas com o auxílio de um fotodocumentador (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Biorad®) e foram contabilizadas (Qi *et al.*, 2024; Whittaker *et al.*, 1979).

4.2.8. Níveis de espécies reativas de oxigênio totais

As cepas BY4741, $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ foram separadas em grupos de células tratadas com solução de butirato de sódio na concentração de 100 μ M e em grupos de células sem tratamento; e submetidas simultaneamente à indução do processo autofágico através da exposição ao meio de privação de nitrogênio (SD-N) e ao meio sem restrição de nitrogênio (SD), como descrito no ensaio de viabilidade autofágica. Após 4 h e 24 h de incubação, uma alíquota de 1,0 mg da suspensão

celular de cada amostra foi retirada, as células lavadas e ressuspensas em tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8), e em seguida foram expostas a 20 µL da sonda fluorescente sensível a EROs 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Life Technologies, EUA), e as suspensões incubadas por 40 min na incubadora tipo shaker à 160 rpm/28 °C. Após a incubação as células foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços preta em triplicata e a intensidade da fluorescência foi medida usando o leitor de microplacas CHAMELEON V nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão) (Eruslanov *et al.*, 2009).

4.2.9. Análise estatística

Os resultados representam a média e o desvio padrão de ao menos três experimentos independentes. O tratamento estatístico foi realizado através do software GraphPad Prism 8 (Prism Software, Irvine, EUA) utilizando-se do teste de análise de variância (One Way, ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey com o intuito de comparar os resultados obtidos pelas diferentes médias. Os dados foram considerados diferentes estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de citotoxicidade do butirato em células de *Saccharomyces cerevisiae*

5.1.1. Cepa BY4741: Análise da taxa específica de crescimento e viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade são ferramentas essenciais para a triagem e avaliação da toxicidade de compostos e suas respectivas concentrações em culturas celulares (Mori *et al.*, 2013). Embora existam vários métodos para verificar a citotoxicidade, os mais comuns baseiam-se na medida da capacidade de crescimento celular (através da taxa específica de crescimento), viabilidade celular ou da atividade metabólica (Longo-Sorbello *et al.*, 2006; Assad *et al.*, 2019).

A taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) mede o aumento da densidade populacional de células ao longo do tempo, indicando se um composto afeta a proliferação celular (Bhatia, 2015). Para calculá-la, geralmente são construídas curvas de crescimento monitorando a concentração da suspensão celular em intervalos de tempo regulares (Olivares-Marin *et al.*, 2018; Guinn *et al.*, 2022). Durante o monitoramento do crescimento celular, a taxa é obtida nas fases de crescimento exponencial, onde a taxa é diretamente proporcional a concentração da biomassa celular (Stanbury *et al.*, 2017).

Neste estudo, para avaliar a citotoxicidade do butirato de sódio em concentrações que assemelham-se às encontradas no cólon intestinal (50 μM a 800 μM) (Donohoe *et al.*, 2012), investigou-se a influência de diferentes concentrações de butirato (50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM) sobre a taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa BY4741 (**Tabela 1**). Para isso, a concentração das suspensões celulares foi monitorada por 24 h, até que estas atingissem a fase estacionária. A taxa de crescimento específica foi calculada utilizando-se apenas as densidades celulares obtidas durante a fase exponencial do crescimento (**Figura 20**). É importante ressaltar que, na presença de toxicidade observa-se alteração nessa taxa.

Tabela 1: Taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da cepa BY4741 exposta a diferentes concentrações de butirato de sódio ao longo de 24 h. As letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes entre si para $P < 0,05$.

Taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)	
0 μM	$0,793 \pm 0,06^a$
50 μM	$0,801 \pm 0,05^a$
100 μM	$0,774 \pm 0,06^a$
150 μM	$0,777 \pm 0,07^a$
200 μM	$0,778 \pm 0,04^a$

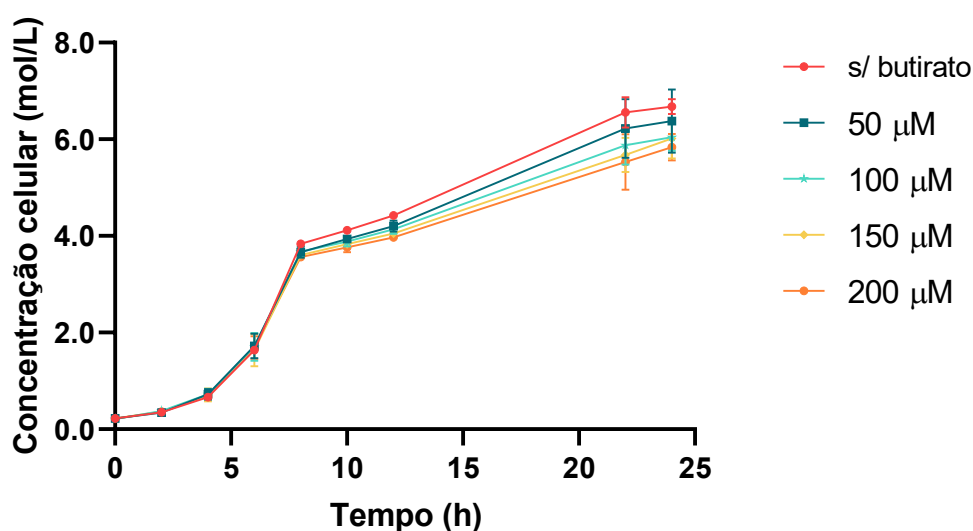


Figura 20: Curva de crescimento celular da cepa BY4741. O crescimento celular foi monitorado pela leitura da densidade óptica (DO) em 570 nm de suspensões celulares ao longo de 24 h de proliferação das células na presença de diferentes concentrações da solução de butirato de sódio (50, 100, 150 e 200 μM).

Os resultados obtidos na aferição da taxa específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) demonstram que a faixa de concentração entre 50 e 200 μM não afeta o crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo, portanto, considerada não-tóxica e passível de ser usada nos próximos ensaios que visam a influência do butirato sobre etapas do metabolismo autofágico. A ausência de citotoxicidade nesse estudo era esperada, visto que as concentrações utilizadas nesse experimento são inferiores às aquelas demonstradas na literatura utilizando

células de *S. cerevisiae*. Por exemplo, um estudo observou toxicidade apenas na concentração de 15,04 mM ($1,5 \times 10^4$ μ M), um valor significativamente superior ao empregado nesse estudo. A discussão dos autores aponta que a toxicidade pode surgir do uso de concentrações elevadas de butirato. Nessas condições, o composto foi capaz de acidificar o ambiente celular e, por sua natureza lipofílica, seu acúmulo pode comprometer a integridade da membrana plasmática, resultando em uma maior permeabilidade (Mota *et al.*, 2024). Além disso, em concentrações elevadas o butirato é conhecido como um inibidor da enzima histona desacetilase (HDAC), o que poderia suprimir a proliferação celular e até induzir a apoptose nas células de levedura (Nguyen *et al.*, 2011).

Estudos anteriores em outros modelos celulares como linhagens de hepatoma (SK-Hep1 e SMMC-7721) também demonstraram que o butirato não é tóxico em concentrações abaixo de 500 μ M após 24 h de exposição (Jiang *et al.*, 2012). De forma semelhante, Carretta *et al.* (2016) observaram a ausência de efeitos citotóxicos em neutrófilos bovinos expostos a butirato em concentrações inferiores a 1000 μ M. Esses estudos convergem com os resultados obtidos nesse trabalho, reforçando a ideia de que o butirato apresenta baixa toxicidade nas faixas de concentração utilizadas.

Embora as curvas de crescimento possibilitem o cálculo da taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), elas são consideradas limitadas por se basearem na leitura de turbidez das suspensões celulares ao longo do tempo. Essa característica impossibilita a diferenciação entre células vivas das mortas, o que pode ocasionar uma superestimação da população viável (Krishnamurthi *et al.*, 2021). Para contornar essa limitação e obter uma avaliação mais precisa da citotoxicidade, realizou-se um ensaio complementar de viabilidade celular.

O ensaio de viabilidade celular concentra-se na análise do número de células com o metabolismo proliferativo ativo em uma amostra, permitindo verificar o efeito citotóxico de um composto. A exposição das culturas celulares a substâncias tóxicas ocasiona uma diminuição da viabilidade funcional e metabólica, fornecendo uma análise mais precisa do impacto do composto nas células (Stoddart *et al.*, 2011; Kamiloglu *et al.*, 2020).

Com o intuito de determinar se a exposição ao butirato afeta o metabolismo proliferativo das células de *S. cerevisiae* (BY4741), avaliou-se a viabilidade celular de culturas expostas a diferentes concentrações de butirato (50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM). O monitoramento da viabilidade celular foi realizado através do plaqueamento das suspensões celulares após períodos de 2 h, 6 h e 24 h de exposição das células à solução de butirato de sódio (**Figura 21**). Este método baseia-se na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). É válido ressaltar que, na ausência de citotoxicidade, a viabilidade das células tratadas deve permanecer semelhante à das células não expostas ao butirato.

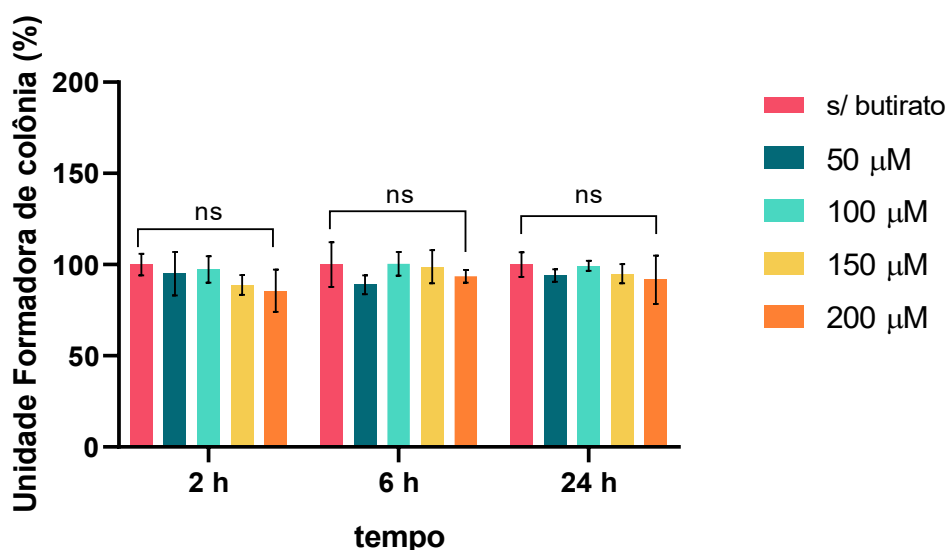


Figura 21: Análise da toxicidade do butirato de sódio por viabilidade celular. Percentual de viabilidade celular baseado na contagem de colônias após incubação por 2, 6 e 24 h das suspensões celulares com solução de butirato de sódio (50, 100, 150 e 200 μM) em comparação com células sem incubação (controles negativos). One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$).

Como esperado, os resultados indicaram que não houve redução na porcentagem de colônias e, conseqüentemente, na viabilidade celular das células tratadas com butirato de sódio nas concentrações testadas (50 a 200 μM). Isso demonstra que as células mantiveram-se tão viáveis quanto as amostras controle não tratadas com butirato. Esse comportamento corrobora as conclusões da análise anterior da taxa de crescimento, reforçando a evidência da ausência de citotoxicidade do butirato em baixas concentrações em células de levedura.

Estudos que avaliam o impacto do butirato em baixas concentrações na viabilidade celular em modelos de levedura são escassos na literatura. Contudo, há

pesquisas utilizando outros modelos celulares, como as células de adenocarcinomas de cólon humano (HT29), as quais demonstraram que concentrações de butirato próximas a 500 μ M ocasionaram uma redução de viabilidade menor que concentrações mais elevadas, como 5,0 mM (Chiang *et al.*, 2021). Essa observação é corroborada por Li *et al.* (2015), que não encontraram efeito citotóxico na viabilidade celular na linhagem celular embrionária humana (HEK293) em uma concentração de 100 μ M, uma das concentrações utilizadas no presente estudo (**Figura 21**). Esses dados da literatura convergem com os resultados obtidos nesse trabalho, demonstrando que as concentrações empregadas nesse experimento não foram elevadas o suficiente para que promovesse danos metabólicos às células capazes de reduzir sua viabilidade por citotoxicidade.

Dentre as concentrações testadas, a concentração de 100 μ M de butirato destaca-se devido a sua capacidade de influenciar processos metabólicos importantes. Estudos anteriores revelaram que essa concentração foi suficiente para promover o aumento da citocina imunossupressora multifuncional TGF- β 1 em fibroblastos de murinos (Castro *et al.*, 2021). O TGF- β 1 é essencial para a regulação da proliferação celular e participa da depuração de proteínas amiloides no cérebro (Wollmer *et al.*, 2010). Além disso, a concentração de 100 μ M também foi capaz de contribuir para a homeostase intestinal ao promover a elevação de expressão de genes MU2 e MUC5AC que estão relacionados a produção de mucinas (Giromini *et al.*, 2022). Essas mucinas são fundamentais para a formação da camada muco-gel que protege a mucosa gastrointestinal e permite uma maior adesão da microbiota no lúmen intestinal (Liu *et al.*, 2020; Krasinskas *et al.*, 2011). Por todas essas razões, a concentração de 100 μ M de butirato foi definida como a concentração padrão para os experimentos subsequentes, visando investigar sua influência no processo autofágico.

5.1.2. Cepas mutantes em $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$: Avaliação da atividade metabólica

Conforme discutido na revisão bibliográfica na Seção 2.1. (p. 19), o processo autofágico é essencial para a renovação de componentes citoplasmáticos e, por essa razão, atua em níveis basais em todos os organismos eucarióticos, independentemente de fatores externos (Levine *et al.*, 2019; Kuchitsu *et al.*, 2018). A deleção de genes importantes para essa via, como nas cepas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$,

pode desregular a autofagia e, consequentemente, impactar o metabolismo celular mesmo quando essas células não são submetidas a estressores conhecidos por aumentar o fluxo autofágico, como a privação de nitrogênio (Mizushima *et al.*, 2007; Gulias *et al.*, 2023; Boutouja *et al.*, 2019; Maeda *et al.*, 2017).

Devido aos fatores citados, é importante estabelecer a atividade metabólica basal das cepas mutantes em genes autofágicos na ausência de indução da autofagia e em exposição ao butirato. Essa avaliação inicial é fundamental para identificar se as linhagens $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ já apresentam alterações metabólicas pré-existentes e se o butirato, por si só, compromete a atividade metabólica dessas cepas. Realizando essa etapa prévia, pode-se inferir que as observações feitas durante a indução da autofagia possam ser atribuídas de forma precisa à disfunção autofágica, e não a alterações metabólicas já presentes nas linhagens disfuncionais durante exposição ao butirato.

Para uma avaliação preliminar do impacto da exposição a 100 μ M de butirato na atividade metabólica basal da cepa BY4741 e de suas mutantes isogênicas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ durante 24 h, empregou-se o ensaio colorimétrico com o reagente resazurina (**Figura 22**). O método da resazurina é amplamente reconhecido para avaliar a atividade metabólica celular e baseia-se na capacidade de enzimas metabólicas, como as desidrogenases presentes em células ativas e saudáveis, de reduzir a resazurina (azul) em resorufina (rosa e fluorescente) utilizando poder redutor gerado no metabolismo celular (Petiti *et al.*, 2024). Células mortas ou com metabolismo comprometido não realizam essa conversão, o que resulta na manutenção da cor azul da resazurina e em uma leitura de menor intensidade de fluorescência, indicando baixa ou nenhuma atividade metabólica.

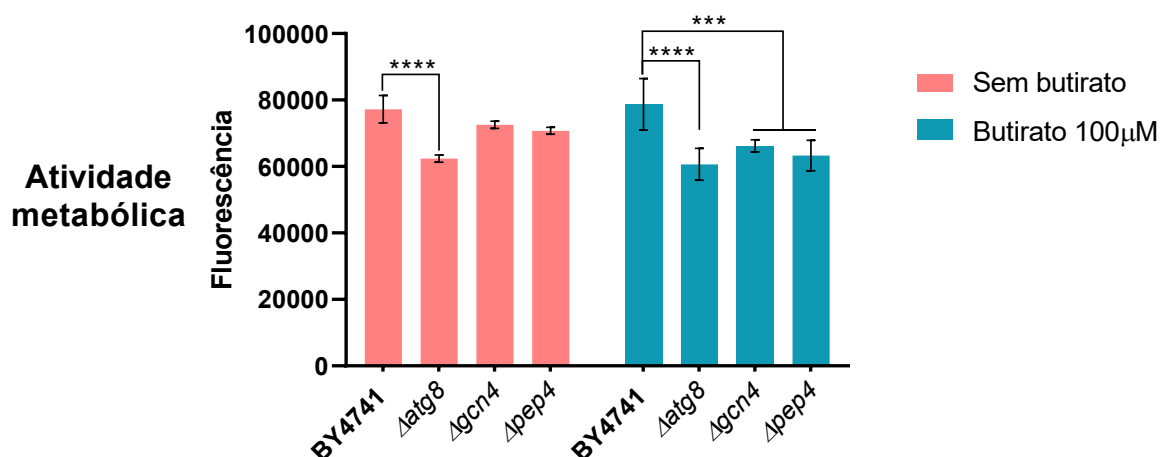


Figura 22: Fluorescência da resorufina na cepa BY4741 e em suas mutantes isogênicas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ com e sem exposição ao butirato de sódio por 24 h. Através dos valores da fluorescência da resorufina obtidos na cepa BY4741 e nas mutantes $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ com ou sem exposição ao butirato, pode-se avaliar o impacto do butirato na atividade metabólica das células. Análise estatística: One Way Anova (***) $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Os resultados mostraram que, entre as cepas mutantes com deleção no sistema autofágico, a $\Delta atg8$ já apresentava uma atividade metabólica basal naturalmente menor, com cerca de 20 % inferior à cepa controle (BY4741). No entanto, a sua exposição ao butirato de sódio não a comprometeu ainda mais. As cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ não demonstraram uma redução significativa de atividade metabólica quando comparadas a controle (BY4741). Contudo, o tratamento com 100 μ M de butirato reduziu a atividade metabólica das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ em 16 % e 20 %, respectivamente. Na literatura, a avaliação da atividade metabólica em cepas mutantes em $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$, como as utilizadas neste estudo, é pouco explorada. Porém, é possível correlacionar os resultados obtidos com comportamentos já descritos, que explicam como o butirato pode afetar e reduzir a atividade metabólica observada.

A atividade metabólica reduzida das células da cepa $\Delta atg8$ é provavelmente uma consequência direta da sua incapacidade de formar autofagossomo, dada a ausência da proteína Atg8p. No processo autofágico basal, é indispensável a formação do autofagossomo. Sem essa capacidade, a célula não consegue realizar a depuração de componentes citoplasmáticos danificados, resultando em um acúmulo de organelas ineficientes e compostos tóxicos (Mizushima *et al.*, 2007; Nieto-Torres

et al., 2021). Esse acúmulo, por sua vez, compromete a homeostase celular e, consequentemente, diminui a atividade metabólica. Por outro lado, o butirato não pareceu intensificar os danos resultantes da perda da capacidade autofágica, já que a exposição do composto às células de $\Delta atg8$ não ocasionou uma redução adicional de sua atividade metabólica.

Como mencionado na revisão bibliográfica, a cepa $\Delta gcn4$ apresenta uma incapacidade de gerar de forma constitutiva respostas transcricionais adaptativas devido à ausência no fator de transcrição Gcn4p, e isso pode torná-las mais sensíveis à metabolização do butirato pelas células. Um exemplo disso seria que o butirato, em baixas concentrações, pode ser degradado pelas células por meio da β -oxidação, podendo gerar impactos na função mitocondrial (Lacroux *et al.*, 2022; Donohoe *et al.*, 2011). Como o Gcn4p é um fator de transcrição capaz de regular genes relacionados a função mitocondrial, sua ausência resultaria em uma resposta adaptativa inadequada à presença do butirato e de seus metabólitos (Gulias *et al.*, 2023). Isso levaria a um estresse metabólico, justificando a redução da atividade metabólica observada nas células da cepa $\Delta gcn4$ expostas ao butirato.

Em células da cepa $\Delta pep4$, já foi demonstrado que a exposição a um ácido graxo de cadeia curta, como o acetato, pode ocorrer a indução de danos celulares (Pereira *et al.*, 2010). Devido à ausência de Pep4p, uma protease crucial no processo degradativo, a capacidade de degradação é comprometida resultando em prejuízos na manutenção da homeostase metabólica intracelular (Jones *et al.*, 1982). De forma similar, essa dinâmica também pode ocorrer com o butirato, mesmo que em concentrações mais baixas. A exposição a esse composto pode levar ao acúmulo de danos celulares. Consequentemente, a inaptidão da cepa $\Delta pep4$ em realizar a degradação eficiente pode ocasionar uma redução na atividade metabólica.

Com base nos resultados desse ensaio, pode-se constatar que, previamente, a exposição das células a 100 μ M de butirato de sódio pode comprometer a atividade metabólica das células mutantes das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$. Contudo, é fundamental investigar se esse impacto persiste durante o crescimento dessas cepas em um meio que induz a autofagia, como o meio privativo de nitrogênio (SD-N). Essa etapa é importante para determinar se esse comportamento observado está diretamente relacionado à disfunção no processo autofágico.

5.2. Investigação da influência do butirato no metabolismo autofágico

O funcionamento adequado da via autofágica durante estresses metabólicos, como o estresse nutricional, é essencial para a sobrevivência celular (Khandia *et al.*, 2019). Em células de leveduras, o estresse nutricional induzido pela privação de nitrogênio no meio de crescimento celular é o indutor mais potente e frequentemente utilizado para induzir o processo autofágico (Cebollero *et al.*, 2009). Como detalhado na seção 2.6 (p. 39) da revisão bibliográfica, o butirato é conhecido por sua capacidade de modular diversas vias metabólicas, incluindo a autofágica. Portanto, expor cepas mutantes com deleção gênica em *ATG8*, *GCN4* e *PEP4* ao butirato em meio privativo de nitrogênio permitirá investigar como esse composto influencia estes mecanismos relacionados à autofagia.

5.2.1. Avaliação da viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio

O ensaio de determinação direta da viabilidade celular por formação de colônias para o monitoramento da autofagia tem como intuito avaliar a capacidade das células permanecerem viáveis e com metabolismo proliferativo ativo, mesmo após serem expostas a condições privativas de nitrogênio (George *et al.*, 2000). Esse método é uma forma confiável de medir a sobrevivência celular após a indução da autofagia por estresse nutricional, permitindo quantificar a capacidade de formação de células-filhas após indução autofágica (Klionsky *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que células com a função autofágica comprometida exibem uma alteração da viabilidade em relação à cepa controle (Noda, 2008).

Ao combinar este ensaio com a exposição a compostos como o butirato, pode-se verificar se ele atenua ou agrava a perda de viabilidade induzida pela privação de nitrogênio. Essa análise será feita tanto na cepa controle (BY4741) quanto nas cepas com deleções específicas em diferentes etapas do processo autofágico ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$). Isso permitirá analisar o impacto do butirato em baixa concentração sobre a viabilidade dessas cepas disfuncionais no processo autofágico (Sturgeon *et al.*, 2019; Nadal *et al.*, 2010).

5.2.1.1. Cepa BY4741

Com o objetivo de avaliar a influência do butirato em uma cepa com a via autofágica íntegra e funcional sob condições que induzem autofagia, investigou-se o

impacto do tratamento com 100 μ M de butirato de sódio na cepa controle (BY4741) utilizando o ensaio de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Para fins comparativos, as células mantiveram-se em meio sintético suplementado com aminoácidos (SD) e em meio sintético com restrição de nitrogênio (SD-N) sob as mesmas condições de crescimento, sendo incubadas com solução de butirato de sódio por um período de 4 h e 24 h (**Figuras 23a e 23b**).

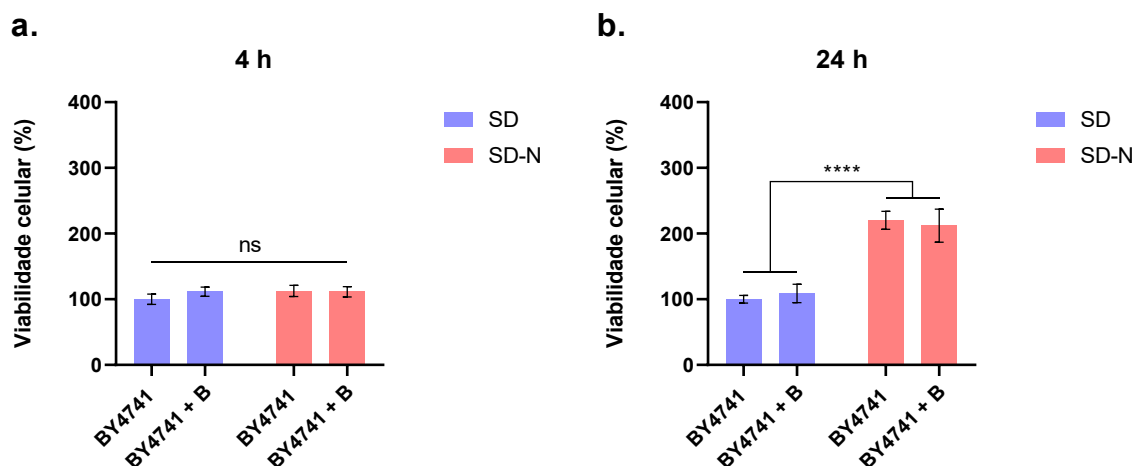


Figura 23: Viabilidade celular da cepa controle (BY4741) em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Células da cepa BY4741 tratadas com solução de butirato de sódio (B) na concentração de 100 μ M por 4 h (**a**) e 24 h (**b**); mantidas previamente nos meios suplementado por aminoácidos (SD) e com restrição de nitrogênio (SD-N). Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$; **** $P < 0,0001$).

Os resultados mostram que o crescimento das células da cepa BY4741 não foi afetado mediante o tratamento com a solução aquosa de butirato de sódio (100 μ M) nas diferentes condições nutricionais e nos tempos estipulados, revelando que não houve influência da exposição do butirato nessa concentração na viabilidade celular da cepa controle (**Figura 23**). Esse comportamento observado era esperado por estar de acordo com os ensaios anteriores, que já indicavam a natureza não-citotóxica do butirato para a cepa BY4741. A ausência de redução na viabilidade celular, mesmo sob condições de indução da autofagia, pode ser justificada pela integridade dos mecanismos de defesa da cepa. A própria via autofágica age como uma resposta adaptativa eficaz, minimizando o estresse metabólico causado pela exposição a compostos exógenos, como o butirato (Suzuki *et al.*, 2011).

Além disso, independentemente do tratamento com o butirato, observou-se que após 24 h houve um aumento de cerca de 120 % da viabilidade das células onde foi induzida a autofagia por restrição de nitrogênio (SD-N) comparado com as células em meio não restritivo (SD) (**Figura 23b**). Essa observação torna-se relevante quando analisada no contexto da literatura. Zhang *et al.* (2015) demonstraram que em uma concentração similar à utilizada nesse estudo, 100 μ M de butirato, trouxe indução de autofagia em células de carcinomas colorretais. Apesar dessa indução, não houve morte celular significativa causada pela intensificação massiva do processo autofágico. Isso sugere que a autofagia pode ser induzida sem necessariamente ocasionar uma redução da viabilidade autofágica, um achado consistente com o que observamos nesse estudo. Corroborando essa perspectiva, Evans *et al.* (2017) também exploraram os efeitos combinados de privação nutricional e a exposição de células epiteliais gengivais (Ca9-22) ao butirato. Os autores constataram que apenas em concentrações superiores a 625 μ M houve uma intensificação do processo autofágico, tão pronunciada que culminou em impactos na morte celular. Em conjunto, os resultados obtidos nessa dissertação e na literatura sugerem que a autofagia pode ser estimulada pela presença do butirato no ambiente celular, porém isso não implica, necessariamente, em um comprometimento ou redução na viabilidade celular (Zhang *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2017).

O aumento da viabilidade celular observado após 24 h em meio privativo de nitrogênio (SD-N) converge com estudos anteriores em leveduras. An *et al.* (2014) relataram um comportamento semelhante na cepa controle de *Saccharomyces cerevisiae* (SEY6210), onde o meio SD-N pareceu estimular o crescimento celular após 4 e 24 h, em comparação com o meio YPD. No entanto, enquanto os resultados obtidos em 24 h nessa dissertação são consistentes, eles divergem dos resultados de 4 h do estudo citado, onde não houve um aumento de viabilidade ligada à diferenciação do meio.

Os dados obtidos no presente estudo após 4 h levam a hipótese de que, na fase inicial da privação de nitrogênio, o consumo de aminoácidos direcionado à síntese proteica como uma resposta adaptativa excede em muito os níveis de aminoácidos livres derivados da autofagia. Isso promove uma queda abrupta do *pool* de aminoácidos, podendo resultar na estagnação do crescimento celular. Contudo, após 24 h há uma redução da quantidade de aminoácidos livres em paralelo a um

aumento da taxa de síntese proteica. Isso denota uma adaptação às condições restritivas, onde as células em exposição prolongada à privação de nitrogênio estimulam a autofagia (Onodera *et al.*, 2005; Degenhardt *et al.*, 2006). Consequentemente, a autofagia pode atenuar o estresse metabólico pela remoção de organelas e proteínas disfuncionais, promovendo a sobrevivência das células e resultando em um aumento da viabilidade celular, como observado na **Figura 23b**.

5.2.1.2. Cepa $\Delta gcn4$

Com o intuito de averiguar a influência do butirato em células com deficiências na resposta adaptativa transcricional à estresses metabólicos e com o sistema de biossíntese de aminoácidos prejudicado sob condições que induzem a autofagia, avaliou-se o impacto do tratamento com 100 μ M de solução de butirato de sódio na cepa mutante $\Delta gcn4$ utilizando o ensaio de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Para essa análise, a cepa $\Delta gcn4$ foi exposta às mesmas condições de crescimento utilizadas anteriormente para a linhagem BY4741, e as suas respectivas viabilidades comparadas com a da cepa controle por um período de 4 e 24 h (**Figuras 24a e 24b**).

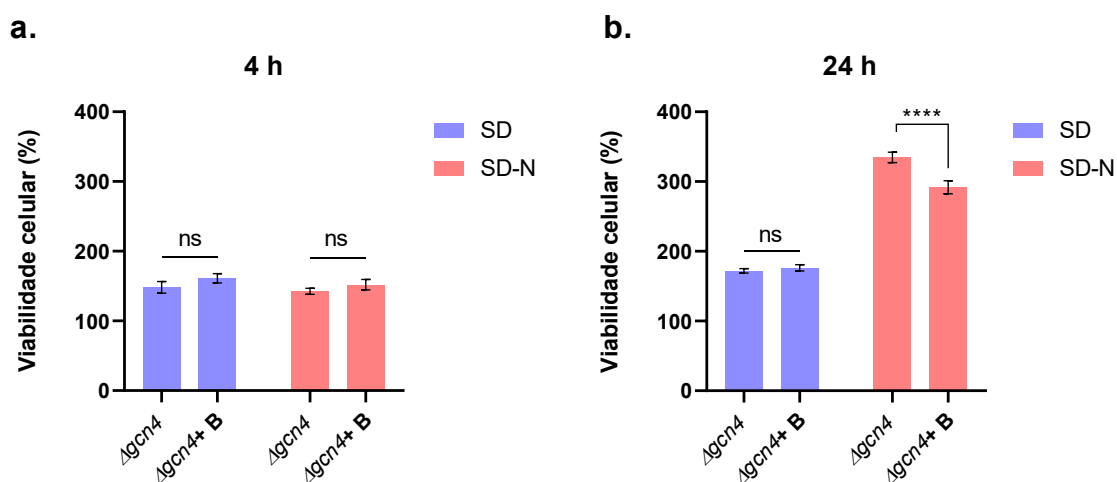


Figura 24: Viabilidade celular da cepa $\Delta gcn4$ em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Células de $\Delta gcn4$ tratadas com solução de butirato de sódio (100 μ M) ($\Delta gcn4 + B$) por 4 h (a) e 24 h (b); mantidas previamente nos meios suplementado por aminoácidos (SD) e com restrição de nitrogênio (SD-N). Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$; **** $P < 0,0001$).

Os resultados obtidos para o horário de 4 h indicaram que a exposição à solução de butirato de sódio (100 μ M) não impactou o crescimento das células da

cepa *Δgcn4* em nenhuma das condições nutricionais. Isso sugere que, nesse período, o butirato não influenciou a viabilidade celular da cepa *Δgcn4* (**Figura 24a**). Entretanto, diferentemente do observado às 4 h, a exposição prolongada ao butirato em 24 h, sob condições privativas de nitrogênio que impulsionam a autofagia, resultou em uma redução de cerca de 13 % na viabilidade da cepa *Δgcn4* em comparação com a mesma cepa sem tratamento com butirato (**Figura 24b**). Isso demonstra que a exposição prolongada ao butirato pode agravar o estresse metabólico de uma célula já naturalmente prejudicada na resposta adaptativa ao estresse, culminando na redução da viabilidade da cepa *Δgcn4* quando exposta ao butirato.

A diminuição da viabilidade observada na cepa *Δgcn4* em exposição prolongada ao butirato pode ser justificada pela forma como este composto é metabolizado dentro das células. Estudos sugerem que, em baixas concentrações, o butirato pode ser processado por leveduras pela via β -oxidação (Donohoe *et al.*, 2012; Guilloteau *et al.*, 2010). Os produtos dessa oxidação podem ser utilizados em diversas vias de síntese, como a produção de lipídeos ou glicose, porém comumente são direcionados para o metabolismo energético produzindo ATP (Zhang *et al.*, 2021; Donohoe *et al.*, 2012; Donohoe *et al.*, 2011). Como demonstrado na seção 2.7.2. (p. 48) da revisão bibliográfica, tanto durante a β -oxidação quanto o caminho subsequente para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) geram espécies reativas de oxigênio (EROs), e se a homeostase redox não for mantida, este excesso de EROs pode desencadear um estresse oxidativo nas células.

O fator de transcrição Gcn4p é fundamental para regular as respostas adaptativas ao estresse, incluindo o estresse oxidativo (Stovall *et al.*, 2021). Sua presença está relacionada à resistência a hiperperóxidos e também à mediação da transcrição de genes responsáveis pela biossíntese de enzimas antioxidantes (Mascarenhas *et al.*, 2008; Lian *et al.*, 2021; Gulias *et al.*, 2023). A ausência desse fator de transcrição pode, portanto, diminuir a eficácia desta resposta a um possível e provável aumento do estresse oxidativo.

Embora a curto prazo, como em exposições de 4 h, as células deficientes em Gcn4p possam demonstrar alguma capacidade de adaptação e até mesmo ativar vias compensatórias, como a via transducional de sinal Msn2p/Msn4p, para lidar com o estresse provocado pelo butirato; a exposição prolongada agrava significativamente essa condição (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010). Com o tempo, o esgotamento dos

nutrientes, somado à indução de estresse oxidativo pelo aproveitamento do butirato pelo metabolismo energético, pode comprometer drasticamente o funcionamento das células da cepa *Δgcn4*. Esse cenário pode acarretar em morte celular, o que explicaria a redução da viabilidade em 24 h.

5.2.1.3. Cepa *Δatg8*

Para investigar como o butirato afeta células com a formação do autofagossomo comprometida durante a indução da autofagia, analisou-se o efeito da exposição de células mutantes de *Δatg8* à solução de butirato de sódio (100 μ M) usando o ensaio de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio durante um período de 4 e 24 h (**Figuras 25a e 25b**).

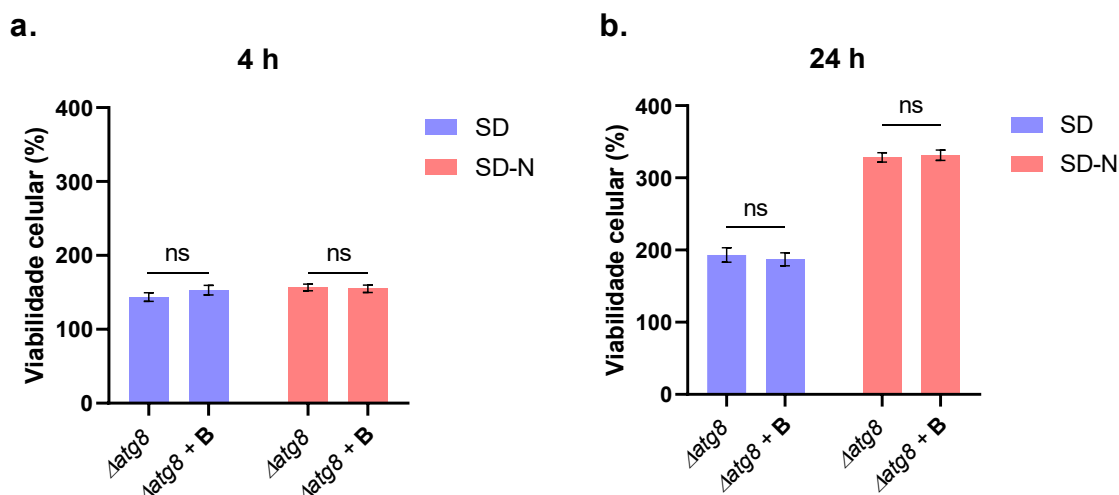


Figura 25: Viabilidade celular da cepa *Δatg8* em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Células da cepa *Δatg8* tratadas com solução de butirato de sódio (100 μ M) (*Δatg8* + B) por 4 h (**a**) e 24 h (**b**); mantidas previamente nos meios suplementado por aminoácidos (SD) e com restrição de nitrogênio (SD-N). Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$).

A análise dos resultados referentes à cepa *Δatg8* sugere que seu crescimento não se alterou após a sua exposição à solução aquosa de 100 μ M de butirato de sódio, independentemente da disponibilidade de nutrientes e do tempo de exposição (**Figuras 25a e 25b**). Isso demonstra que o tratamento com butirato não foi capaz de impactar significativamente a viabilidade da cepa *Δatg8*.

Para compreender a razão do butirato não afetar a viabilidade celular da cepa *Δatg8*, é necessário entender a interação entre a ação do butirato na autofagia e o impacto da ausência da proteína Atg8p nessa via. Conforme mencionado na seção

2.8 (p. 48) da revisão bibliográfica, o butirato estimula a autofagia ao interagir com as vias de sinalização AMPK/TORC1 e PI3K/Akt/TORC1. A resposta dessas interações culmina na inativação do complexo TORC1, o que permite a formação do complexo Atg1p (Coccetti *et al.*, 2018; Pant *et al.*, 2017). Esse complexo, então, é recrutado para o PAS (sítio de montagem do fagóforo), dando início à formação do autofagossomo (Yuan *et al.*, 2017). Nesse processo, a presença de Atg8p é importante para a expansão e formação do autofagossomo; e sua ausência compromete o processo e interrompe o fluxo autofágico, pois não há vias compensatórias conhecidas para suprir a perda de sua função (Nieto-Torres *et al.*, 2021).

Assim, mesmo que o butirato ative as vias de sinalização que normalmente promovem a autofagia, a falta de um componente essencial como Atg8p impede que essa ação resulte em um alívio do estresse metabólico ocasionado pela perda da função autofágica, o que, de outra forma, aumentaria a viabilidade celular. Da mesma forma, o butirato também não parece causar mais danos às células da $\Delta atg8$, o que se manifestaria em uma diminuição da viabilidade. Isso explica por que a exposição ao butirato não altera a viabilidade da cepa $\Delta atg8$: a ausência dessa proteína inviabiliza o fluxo autofágico e, conseqüentemente, uma possível atuação do butirato nessa via.

A hipótese de que a ausência de Atg8p impede a ação do butirato no processo autofágico é corroborada por estudos como os de Wen *et al.* (2024) e Jiang *et al.* (2020). Embora esses estudos não utilizem *S. cerevisiae* como modelo, eles demonstraram que baixas doses de butirato aumentaram a expressão da proteína LC3p (a homóloga de Atg8p em mamíferos) e sua isoforma ativa, LC3-IIp, em hipocampus de ratos Sprague–Dawley e em células epiteliais gengivais humanas, respectivamente. Além disso, a literatura já estabeleceu que o acúmulo de LC3p, induzido pelo butirato, está ligado à interação desse composto com as vias de sinalização AMPK/TORC1 (Wang *et al.*, 2020). Juntos, esses dados e os resultados obtidos reforçam a ideia de que, sem a presença da Atg8p, o butirato não consegue influenciar o fluxo autofágico.

5.2.1.4. Cepa $\Delta pep4$

Com o propósito de averiguar o efeito do butirato sobre células com a degradação da carga autofágica disfuncional, investigou-se o impacto da exposição

de uma solução de butirato (100 μ M) sob células mutantes $\Delta pep4$ mediante o uso do ensaio de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio após um período de 4 e 24 h (**Figuras 26a e 26b**).

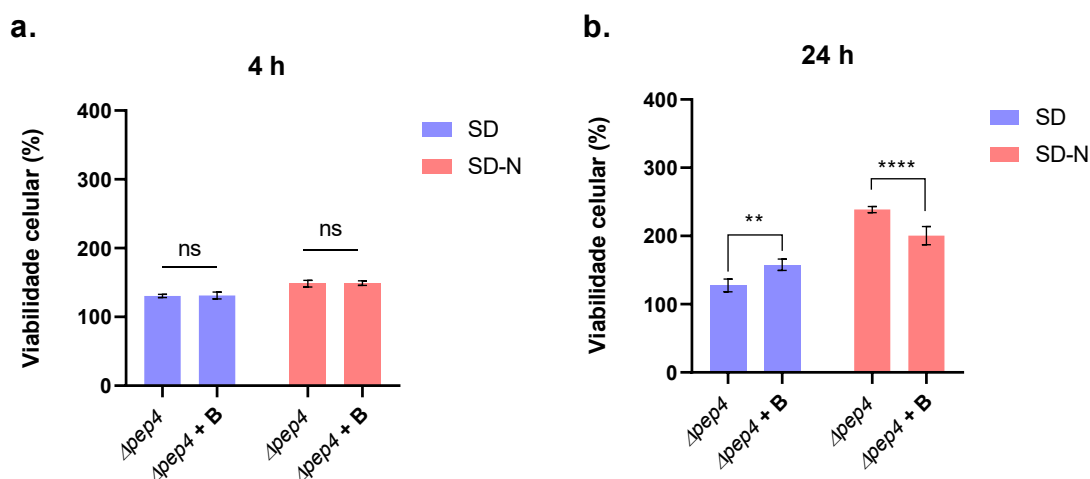


Figura 26: Viabilidade celular da cepa $\Delta pep4$ em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio. Células da cepa $\Delta pep4$ tratadas com solução de butirato de sódio (100 μ M) ($\Delta pep4 + B$) por 4 h (**a**) e 24 h (**b**); mantidas previamente nos meios suplementado por aminoácidos (SD) e com restrição de nitrogênio (SD-N). Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$).

Analisando os resultados obtidos para o período de 4 h, observa-se que, assim como nas cepas mutantes anteriores, o tratamento com 100 μ M de solução de butirato de sódio não alterou o crescimento celular da cepa $\Delta pep4$ em nenhuma das condições nutricionais testadas (**Figura 26a**). Esse padrão, comum a todas as cepas avaliadas, sugere que 4 h é um tempo insuficiente para que a influência do butirato se manifeste na viabilidade, seja na cepa $\Delta pep4$, na BY4741, ou em outras mutantes isogênicas como a $\Delta gcn4$ e a $\Delta atg8$.

Durante o período de 24 h, a viabilidade celular da cepa $\Delta pep4$ mostrou-se sensível tanto à presença de aminoácidos no meio de crescimento quanto a solução de butirato (100 μ M) (**Figura 26b**). Em meio SD, a exposição ao butirato resultou em um aumento de aproximadamente 24 % na viabilidade da cepa $\Delta pep4$ quando comparada à mesma cepa não tratada. Por outro lado, quando as células de $\Delta pep4$ foram cultivadas em meio SD-N, induzindo o processo autofágico por estresse nutricional, o tratamento com butirato causou uma redução de cerca de 16 % na viabilidade da cepa $\Delta pep4$ em comparação à mesma cepa sem butirato. Esses

resultados indicam que o efeito do butirato na cepa *Δpep4* depende do meio nutricional: ele é benéfico em condições nutricionais ricas em aminoácidos, aumentando a viabilidade da cepa mutante; no entanto, em situações de estresse nutricional que induzem a autofagia o efeito será prejudicial, culminando na perda da viabilidade da cepa *Δpep4*.

Para entender o porquê do butirato atuar de forma diferente em células *Δpep4* sob distintas condições nutricionais e como isso se relaciona com a autofagia, é fundamental compreender o impacto da ausência de Pep4p nesses dois cenários. Como explicado na seção 2.5.3 (p. 37) da revisão bibliográfica, a Pep4p é uma protease de cascata fundamental para a degradação do autofagossomo no vacúolo. Quando essa proteína é deletada, a degradação torna-se ineficiente devido à inativação de outras proteases e hidrolases vacuolares. Consequentemente, isso pode levar a um acúmulo de autofagossomos tanto no vacúolo quanto no citoplasma, tornando essas células metabolicamente estressadas de forma inerente, já que a autofagia basal continua ocorrendo mesmo sem estímulos externos (Button *et al.*, 2017; Carmona-Gutiérrez *et al.*, 2011).

Em condições de abundância de nutrientes, o aumento de viabilidade das células a cepa *Δpep4* após a exposição ao butirato sugere que este composto está, de alguma forma, promovendo a proliferação celular e compensando parcialmente a disfunção autofágica causada pela ausência de Pep4p. Sabe-se que o butirato, ao ser metabolizado pelas células de levedura, principalmente via β -oxidação, pode modular diversas vias celulares (Strijbis *et al.*, 2010; Pérez-Escuredo *et al.*, 2016). É possível que este composto possa estar regulando vias de sinalização pró-sobrevivência (Donohoe *et al.*, 2012); atenuando o estresse metabólico basal naturalmente presente nas células (Li *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2020); ou até mesmo apenas servindo como fonte de energia para a produção de ATP (Guilloteau *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011). Esses fatores, somados à disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo, podem induzir uma resposta adaptativa ao estresse metabólico inerente às células da cepa *Δpep4*, resultando no aumento de viabilidade observado em meio sintético rico em aminoácidos na presença do butirato em 24 h.

Em condições de privação de nitrogênio, o processo de autofagia é intensificado nas células *Δpep4*. No entanto, como a degradação e a reciclagem de nutrientes nessas células é ineficiente, elas não conseguem gerar a energia e os

nutrientes necessários a partir da autofagia, o que agrava o estresse metabólico já existente (Carmona-Gutiérrez *et al.*, 2011; Tsukada *et al.*, 1993). A adição do butirato nesse cenário de estresse severo pode estimular ainda mais a via autofágica através das vias de sinalização AMPK/TORC1 e PI3K/Akt/TORC1, resultando em um aumento na produção e no consequente acúmulo de autofagossomos não degradados (Clark *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). Esse acúmulo pode se tornar tóxico às células (Button *et al.*, 2017). Além disso, pesquisas indicam que a metabolização de ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, pode levar a um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), intensificando o estresse oxidativo nas células $\Delta pep4$ (Oliveira *et al.*, 2015; Alugoju *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2010). Com a degradação comprometida e o aumento do estresse oxidativo somado ao acúmulo de autofagossomos não degradados ao longo do tempo, os danos celulares podem se tornar irreversíveis, culminando na morte celular e na consequente perda de viabilidade, conforme observado nos resultados desse estudo.

5.2.2. Formação de colônias *petite* durante a viabilidade celular

Durante o ensaio de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio realizado anteriormente, verificou-se a presença de colônias de tamanho reduzido, conhecidas como *petite*, independente do tempo de crescimento celular e das condições de crescimento estabelecidas. Descritas pela primeira vez por Ephrussi *et al.* em 1955, essas colônias *petite* caracterizam-se por apresentar um tamanho marginalmente menor do que as colônias padrão de suas linhagens ancestrais (**Figura 27**) (Hess *et al.*, 2009; Whittaker *et al.*, 1979).

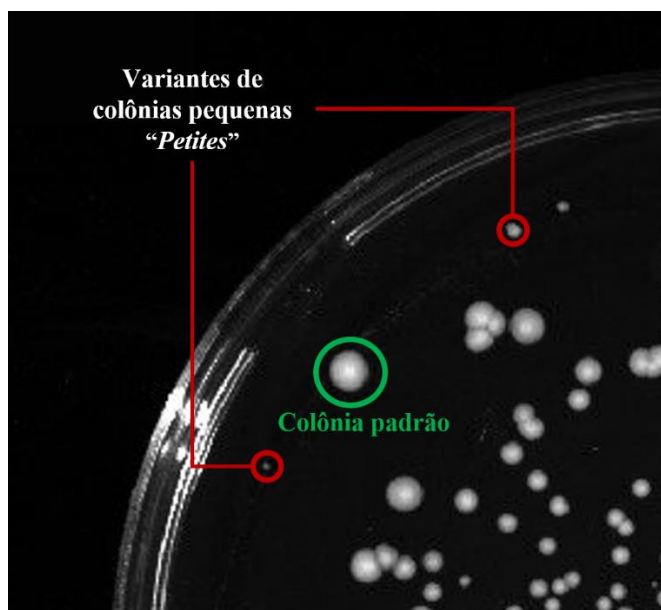


Figura 27: Diferença entre as colônias com tamanho padrão e as colônias *petite*. Comparação entre o crescimento de colônias em placas de Petri contendo meio YPD 2 % sólido. As colônias *petite* apresentam um diâmetro menor do tamanho característico comum.

Essas pequenas colônias surgem por deficiências no metabolismo energético que resultam na perda da função respiratória aeróbica, tornando as células dependentes da respiração anaeróbica. Consequentemente, elas apresentam uma taxa de crescimento muito mais lenta e formam colônias menores (Qi *et al.*, 2024; Lipinski *et al.*, 2010). Devido a essa característica fisiológica e genética distinta, mesmo que essas células apresentem metabolismo proliferativo ativo, elas não são metabolicamente competentes por terem essa disfunção respiratória (Epstein *et al.*, 2001; Vowinckel *et al.*, 2021). Portanto, incluí-las em ensaios de viabilidade celular pode superestimar o número de células realmente viáveis.

Sendo assim, a contabilização separada das colônias *petite* é fundamental para uma avaliação mais precisa da saúde metabólica e funcionalidade da população de leveduras. Essa análise será feita tanto na cepa controle (BY4741) quanto nas cepas com autofagia disfuncional ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$) nos tempos de 4 h e 24 h. Isso permitiu investigar o impacto do butirato em baixa concentração na formação dessas variantes *petite* nas diferentes cepas, fornecendo informações importantes sobre a função respiratória e a capacidade de resposta ao estresse celular.

5.2.2.1. Influência do butirato na formação de *petite* em 4 h

Para avaliar a influência da exposição a uma solução de butirato de sódio (100 μ M) nas cepas BY4741, $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ durante um período de 4 h, quantificou-se as colônias *petite* a partir da diferença do tamanho entre as colônias para cada uma das cepas (Figura 28).

4 h

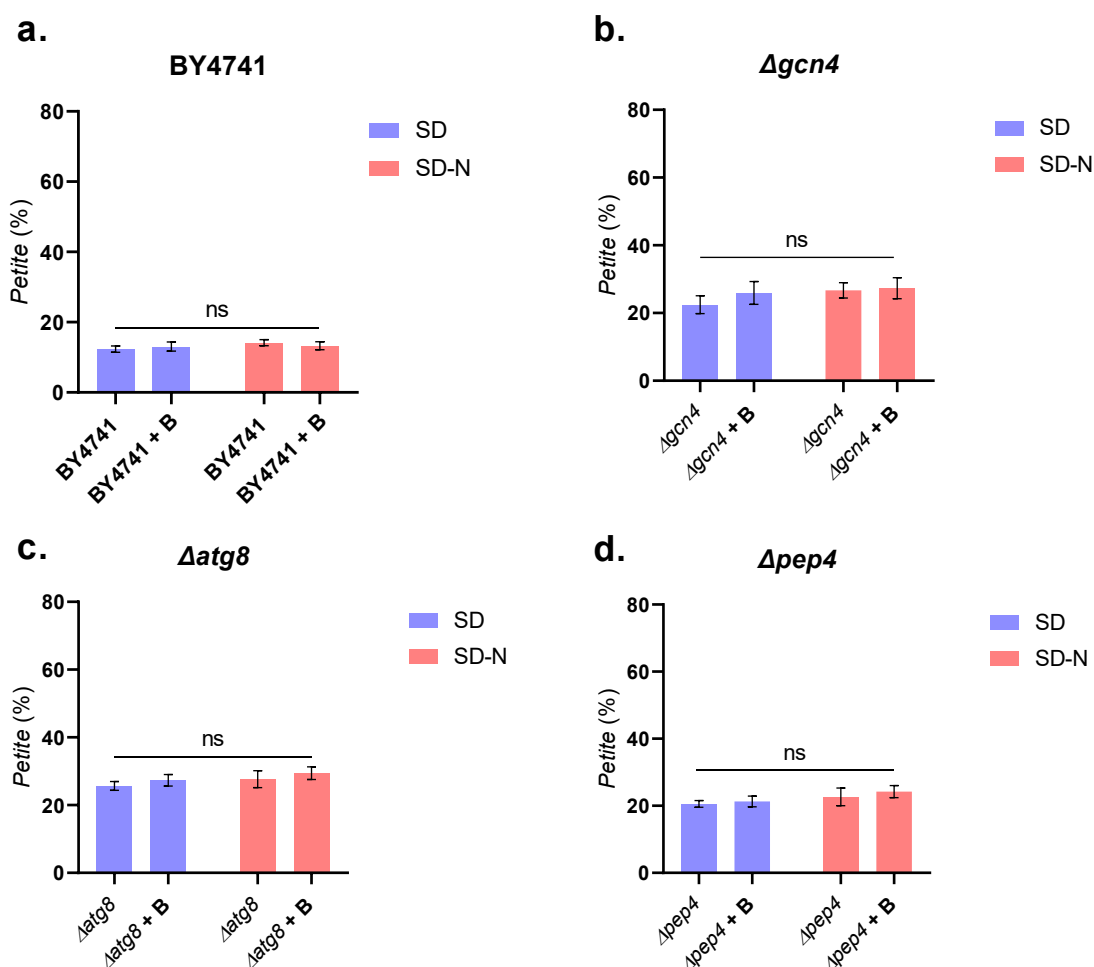


Figura 28: Formação de colônias *petite* das cepas BY4741 e mutantes no processo autofágico tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 4 h. Formação de colônias *petite* das cepas a: BY4741; b: $\Delta gcn4$; c: $\Delta atg8$; e d: $\Delta pep4$ durante a viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio mediante a exposição ao butirato e em meio SD e SD-N após 4h. Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$).

Os resultados indicaram que a exposição ao butirato de sódio por 4 h não alterou a quantidade de colônias *petite* em nenhuma das cepas testadas. Além disso,

não houve diferença estatística entre os diferentes meios de crescimento, sugerindo que a indução da autofagia por restrição de nitrogênio nesse curto período não foi suficiente para influenciar a formação de colônias *petite*. Contudo, as cepas mutantes apresentaram o dobro do número de colônias *petite* em relação à cepa controle em ambos os meios de cultivo.

Como observado nas análises de viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio, esse comportamento pode ser atribuído ao curto período de 4 h, que parece ser um tempo insuficiente para gerar uma resposta adaptativa significativa às condições estressantes aplicadas. Isso se aplica a todas as cepas testadas (BY4741, $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$), impedindo um impacto perceptível na quantidade de colônias *petite* quando comparadas às mesmas cepas não tratadas. Vale ressaltar que essa falta de alteração perceptível nesse tempo pode estar ligada à sensibilidade do ensaio aplicado (Aslantürk *et al.*, 2018).

No entanto, foi possível notar que as cepas deficientes em diferentes etapas do processo autofágico apresentaram uma tendência de formação de *petite* superior a cepa controle (BY4741), denotando que as cepas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ já poderiam apresentar uma disfunção na sua função respiratória em níveis basais (Hess *et al.*, 2009).

5.2.2.2. Influência do butirato na formação de *petite* em 24 h

Com o intuito de determinar a influência da exposição a uma solução aquosa de butirato de sódio (100 μ M) nas cepas BY4741, $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ durante um período de 24 h, quantificou-se as colônias *petite* a partir da diferença do tamanho entre as colônias para cada uma das cepas em um período de tempo mais prolongado (**Figura 29**).

24 h

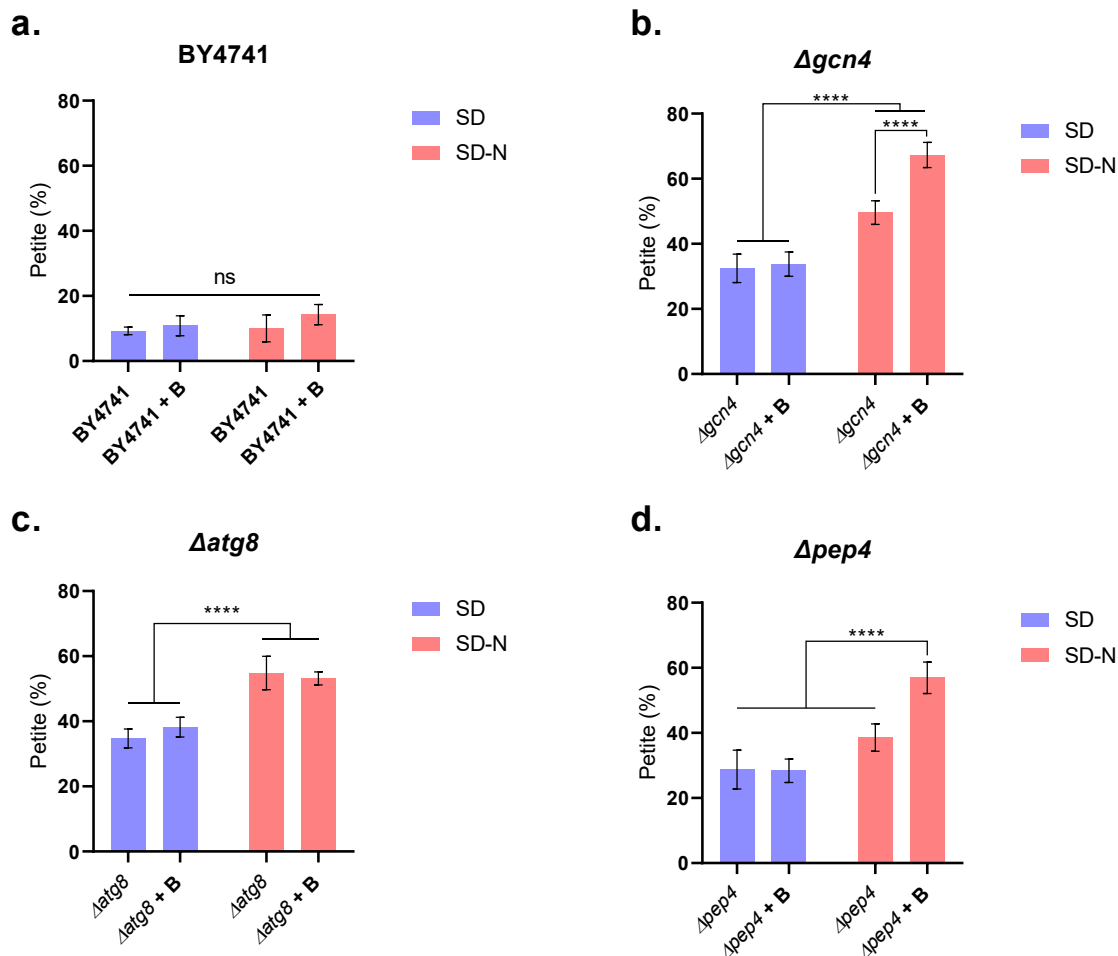


Figura 29: Formação de colônias *petite* das cepas BY4741 e mutantes no processo autofágico tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 24 h. Formação de colônias *petite* das cepas a: BY4741; b: $\Delta gcn4$; c: $\Delta atg8$; e d: $\Delta pep4$ durante a viabilidade celular em resposta à autofagia induzida por privação de nitrogênio mediante a exposição ao butirato e em meio SD e SD-N após 24 h. Análise estatística: One Way Anova (** $P < 0,0001$).**

A análise dos resultados de formação de colônias *petite* após 24 h revelou padrões distintos entre as cepas, mesmo na ausência de tratamento com butirato. Somente as cepas BY4741 e $\Delta pep4$ mantiveram uma quantidade similar de variantes *petite* no meio sintético indutor de autofagia (SD-N), em comparação com suas respectivas culturas em meio sintético suplementado com aminoácidos (SD) (**Figuras 29a e 29d**). Por outro lado, as cepas mutantes $\Delta gcn4$ e $\Delta atg8$ apresentaram um aumento significativo na porcentagem de colônias *petite* em meio SD-N (**Figuras 29b e 29c**). Esse aumento foi de aproximadamente 53 % para $\Delta gcn4$ e 58 % para $\Delta atg8$,

quando foram comparadas às mesmas cepas em meio SD, onde a autofagia não é induzida.

Esses resultados indicam que as cepas BY4741 e $\Delta pep4$ conseguem, de algum modo, gerenciar melhor o estresse metabólico e a perda da função respiratória causados pela restrição nutricional em um período mais prolongado, em comparação com as cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta atg8$. Na cepa BY4741, o controle desse estresse pode ser atribuído à própria autofagia, que, em equilíbrio com a biogênese mitocondrial, permite a depuração de mitocôndrias disfuncionais por meio da mitofagia (Qi *et al.*, 2024; Palikaras *et al.*, 2015). Isso ajuda a manter a função respiratória intacta, resultando em uma menor quantidade de *petite*.

No entanto, essa mesma justificativa não se aplica à cepa $\Delta pep4$, pois assim como as cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta atg8$, ela também apresenta disfunções no processo autofágico. A diferença para o seu comportamento divergente reside no fato de que as mutações em $\Delta gcn4$ e $\Delta atg8$ podem inviabilizar a biogênese do autofagossomo, enquanto a mutação em $\Delta pep4$ afeta a etapa de degradação que ocorre após a formação do autofagossomo (Gulias *et al.*, 2023; Nieto-Torres *et al.*, 2021; Lemus *et al.*, 2022). Quando a degradação de mitocôndrias disfuncionais é necessária, ocorrem cascatas de sinalização que as endereçam para os autofagossomos (Doblado *et al.*, 2021). Nas cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta atg8$ sem a formação dessa organela, essas mitocôndrias com a função respiratória comprometida permanecem no citoplasma. Já na cepa $\Delta pep4$, essas mitocôndrias disfuncionais estariam contidas dentro de corpos autofágicos e, mesmo que não sejam degradados eficientemente, essa característica pode resultar em uma menor quantidade de colônias *petite*, pois as mitocôndrias danificadas estarão isoladas ao invés de ficarem livres no citoplasma aumentando a possibilidade de geração de maiores danos às estruturas celulares e no ambiente intracelular.

A análise da influência da exposição das células à solução de butirato de sódio (100 μ M) revelou que, de forma semelhante ao observado na viabilidade celular em resposta à autofagia induzida, o tratamento com butirato não afetou a formação de variantes *petite* nas cepas BY4741 e $\Delta atg8$. No entanto, o butirato pareceu influenciar na formação de *petite* nas cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ sob a indução da autofagia em meio restrito em nitrogênio (SD-N). Em células da cepa $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$, o butirato dobrou a quantidade de colônias *petite* comparada com as mesmas células sem tratamento.

O aumento de colônias *petite* em células $\Delta gcn4$ expostas ao butirato revela que esse composto pode intensificar o dano às mitocôndrias na ausência de Gcn4p durante o processo autofágico. A Gcn4p é importante para a expressão de genes relacionados a biossíntese de aminoácidos e enzimas antioxidantes (Li *et al.*, 2024). A falta de Gcn4p em um meio privado de aminoácidos nas células desencadeia um desequilíbrio no metabolismo de aminoácidos, e uma forma de compensar isso é através da ativação de vias biossintéticas que utilizam o ciclo do TCA para fornecer esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos (Gulias *et al.*, 2023). Isso, por sua vez, eleva o conteúdo redutor que desencadeia uma alta atividade respiratória mitocondrial que está associada a uma alta produção de EROs (Giorgi *et al.*, 2018). Na ausência de Gcn4p as células têm uma capacidade comprometida de responder a estresses metabólicos, como o estresse oxidativo, tornando-as mais vulneráveis; e por isso apresentam uma maior formação de colônias *petite* mesmo sem o tratamento com butirato em meio SD-N (Shenton *et al.*, 2003; Mascarenhas *et al.*, 2008).

O butirato, ao ser metabolizado via β -oxidação, gera subprodutos que podem alimentar o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e intensificar ainda mais a atividade respiratória (Bhat *et al.*, 2015). Em células da cepa $\Delta gcn4$, que já possuem dificuldade em lidar com o estresse oxidativo, a exposição ao butirato pode causar uma sobrecarga de EROs, ocasionando danos mitocondriais e comprometimento da função respiratória, o que resulta em mais colônias *petite*. Paralelamente a esse aumento de *petite*, observa-se uma perda da viabilidade celular, como descrito anteriormente. Isso pode indicar que os danos mitocondriais tornaram-se tão severos que ativam sinais pró-apoptóticos, desencadeando a apoptose que se reflete na perda da viabilidade celular (Marchi *et al.*, 2012).

Assim como em células de $\Delta gcn4$, o aumento de colônias *petite* na cepa $\Delta pep4$ exposta ao butirato sob indução da autofagia indica uma intensificação dos danos mitocondriais, culminando na perda da função respiratória. Como discutido nos resultados anteriores, as células de $\Delta pep4$ podem acumular autofagossomos não degradados no citoplasma e no vacúolo. A exposição ao butirato pode aumentar a taxa de formação dessas organelas, intensificando esse acúmulo característico (Lemus *et al.*, 2022; Button *et al.*, 2017).

A formação contínua desses corpos autofágicos, impulsionada pelo butirato, consome recursos vitais como membranas, proteínas e energia (ATP), sem o

benefício da reciclagem desses componentes, já que a etapa de degradação está comprometida devido à ausência de Pep4p (Mandic *et al.*, 2024; Maruyama *et al.*, 2021; Metur *et al.*, 2024). Essa demanda elevada por recursos, como o ATP, pode forçar as mitocôndrias a aumentar a geração de ATP; o que, a longo prazo, pode resultar em influxo exacerbado de elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, causando danos mitocondriais (Zhao *et al.*, 2019). Essas mitocôndrias disfuncionais, por sua vez, são sinalizadas e necessitam da formação de autofagossomos para sua degradação por mitofagia, criando um ciclo vicioso (Doblado *et al.*, 2021). Contudo, sem a degradação restaurada, ocorre um acúmulo dessas estruturas, aumentando o estresse oxidativo e, em última instância, resultando em danos mitocondriais e, consequentemente, na perda da função respiratória (Button *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2020). Essa perda reflete no aumento da quantidade de colônias *petite* vista na cepa $\Delta pep4$ quando exposta ao butirato.

5.2.3. Influência do butirato sobre a oxidação intracelular nas cepas mutantes no processo autofágico

Como demonstrado pelos dados anteriores, pode estar ocorrendo metabolização do butirato e isso pode impactar a função respiratória de duas formas: via β -oxidação, onde é reaproveitado no metabolismo energético; ou pela indução de processos que exigem maior demanda de ATP, como a formação de autofagossomos. Essa perda da função respiratória está diretamente ligada à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zhao *et al.*, 2019). Embora as EROs possam ser produzidas em vários compartimentos celulares em resposta a estímulos endógenos e exógenos, a maior parte dessas espécies é gerada nas mitocôndrias, dada a sua importante função no metabolismo energético para a produção de ATP (Hong *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2016).

Apesar da sua importância para a sinalização de processos celulares importantes, como crescimento e apoptose, a produção e o acúmulo excessivo dessas espécies reativas de oxigênio comprometem a homeostase celular, resultando no estresse oxidativo (Wrzaczek *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Esse desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos pode danificar diversas biomoléculas e organelas importantes para o funcionamento celular, inclusive a mitocôndria (van der Pol *et al.*, 2019). Isso leva a um comprometimento da função respiratória que, em casos severos, pode resultar na morte celular.

Diversos ensaios permitem avaliar o estado redox das células, sendo uma técnica comum o uso de sondas fluorescentes capazes de medir a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares (Eruslanov *et al.*, 2010). Nesse estudo, a análise da oxidação intracelular da cepa BY4741 e de suas mutantes isogênicas $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ foi realizada com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) após 4 e 24 h de exposição das células ao butirato. Isso permitiu analisar o estresse oxidativo intracelular ocasionado pelo butirato durante a indução do processo autofágico.

5.2.3.1. Oxidação intracelular em 4 h

Para investigar se o butirato influenciaria a produção de espécies reativas de oxigênio em 4 h, foi realizado um ensaio de quantificação dos níveis de oxidação intracelular correlacionados com os níveis de espécies reativas totais em todas as cepas nos meios SD e SD-N (Figura 30).

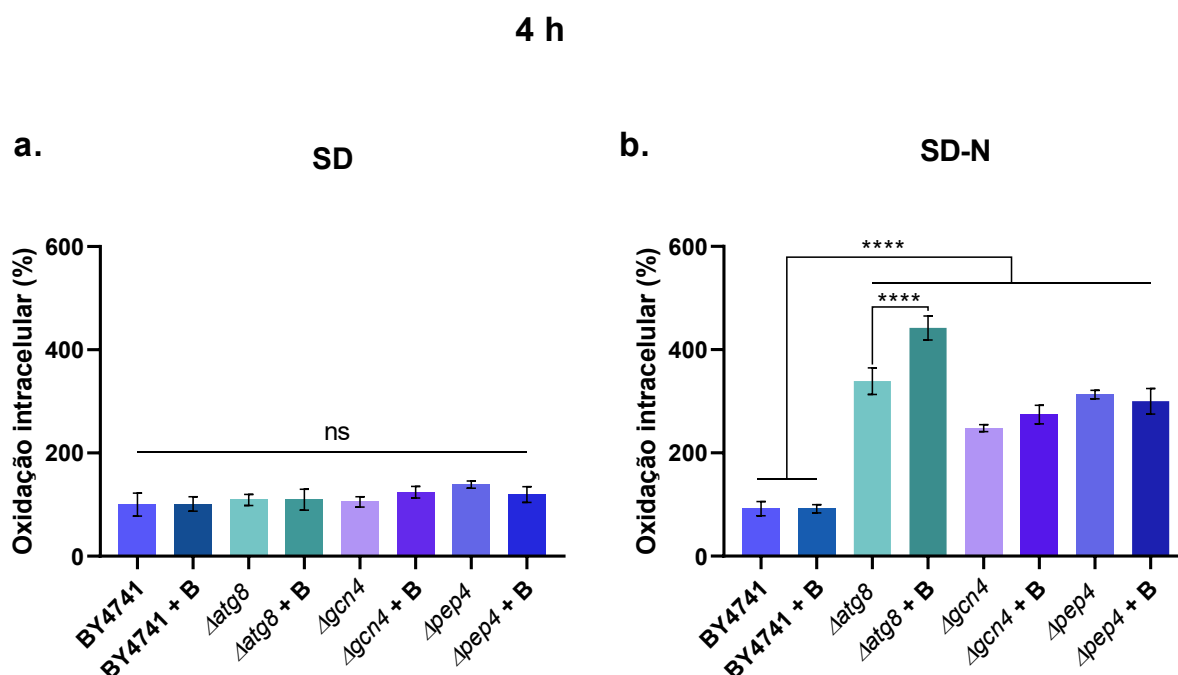


Figura 30: Oxidação intracelular da cepa BY4741 e das cepas mutantes na autofagia ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$) tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 4 h. Níveis de espécies reativas em células das cepas BY4741, $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ tratadas com butirato de sódio (B) mantidas nos meios suplementado por aminoácidos (SD) (a) e com restrição de nitrogênio (SD-N) (b). Análise estatística: One Way Anova (** $P < 0,0001$).**

Os resultados obtidos mostraram que a exposição à solução aquosa de butirato de sódio (100 μ M) por 4 h não alterou os níveis de oxidação intracelular em nenhuma das cepas quando cultivadas em meio sintético suplementado com aminoácidos (SD) (**Figura 30a**). Nessa condição, todas as cepas apresentaram uma porcentagem de oxidação intracelular semelhante. Contudo, em meio privativo de nitrogênio o nível de oxidação intracelular das cepas mutantes no processo autofágico triplicou em relação à cepa controle (**Figura 30b**). Notavelmente, apenas a cepa $\Delta atg8$ pareceu ser influenciada pela exposição ao butirato, apresentando um aumento de cerca de 30 % a mais de oxidação em comparação com a mesma cepa não incubada com o composto.

Em condições nutricionais favoráveis, a ausência de proteínas essenciais para o metabolismo autofágico ($\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$) não modificou os níveis de oxidação intracelular em 4 h. Esse resultado é esperado porque, na presença de abundância em nutrientes, as células têm menor demanda de ativação de mecanismos de reciclagem, como a autofagia. Consequentemente, a relevância de recrutar essas proteínas específicas diminui, fazendo com que o comportamento das cepas mutantes se assemelhe ao da cepa controle (Delorme-Axford *et al.*, 2015). Além disso, mesmo existindo comprometimento do processo autofágico, a manutenção da homeostase redox intracelular pode ser controlada por mecanismos de defesa antioxidante endógenos ou pela biogênese de novas mitocôndrias mediante a disponibilidade de nutrientes (Birben *et al.*, 2012; Atici *et al.*, 2023).

Em condições de privação de nitrogênio, a autofagia é induzida como uma resposta adaptativa ao estresse, promovendo reciclagem de nutrientes e a degradação de componentes disfuncionais que poderiam prejudicar a sobrevivência celular (Sturgeon *et al.*, 2019; Tyler *et al.*, 2018). Nesse cenário, a deficiência em proteínas como Gcn4p, Atg8p e Pep4p, que são importantes para essa via metabólica, prejudica a remoção de organelas danificadas. Isso ocasiona o acúmulo de componentes celulares disfuncionais, como a mitocôndria, que continuam a gerar EROs mesmo quando envoltas em autofagossomos; como no caso de $\Delta pep4$, resultando em um nível um pouco mais elevado de espécies reativas de oxigênio nessas células (Gulias *et al.*, 2023; Suzuki *et al.*, 2011; Button *et al.*, 2017). Esse comportamento não é observado na cepa controle (BY4741), que possui uma via autofágica funcional, indicando que o estresse oxidativo nas cepas mutantes pode ser

resultante da falha na depuração de mitocôndrias disfuncionais (Bakula *et al.*, 2020; De Gaetano *et al.*, 2021). No entanto, é importante notar que, entre as cepas mutantes, somente a cepa $\Delta atg8$ apresentou um aumento adicional das espécies reativas de oxigênio em resposta à exposição ao butirato, sugerindo que células sem Atg8p podem ter uma maior sensibilidade a esse composto inicialmente, algo não observado nas outras cepas.

Mesmo com a elevação nos níveis de oxidação intracelulares, principalmente após a indução da autofagia, esse resultado não influenciou a perda de viabilidade ou da função respiratória, que refletiria em uma redução da viabilidade celular ou num aumento de formação de colônias *petite*, respectivamente. Os ensaios anteriores já haviam demonstrado que não houve alteração com a indução autofágica e a adição de butirato. Esse comportamento sugere que o período de exposição de 4 h foi muito curto para que os níveis elevados de oxidação intracelular causassem danos perceptíveis em testes de viabilidade celular. O aumento observado pode estar relacionado a uma resposta inicial das células ao estresse nutricional (Olsen *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 1998).

5.2.3.2. Oxidação intracelular em 24 h

Com o intuito de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pelas cepas BY4741, $\Delta gcn4$, $\Delta atg8$ e $\Delta pep4$ mediante a exposição a 100 μ M de solução aquosa de butirato de sódio após 24 h, quantificou-se os níveis de oxidação intracelular correlacionados com os níveis de espécies reativas totais nos meios SD e SD-N (**Figura 31**).

24 h

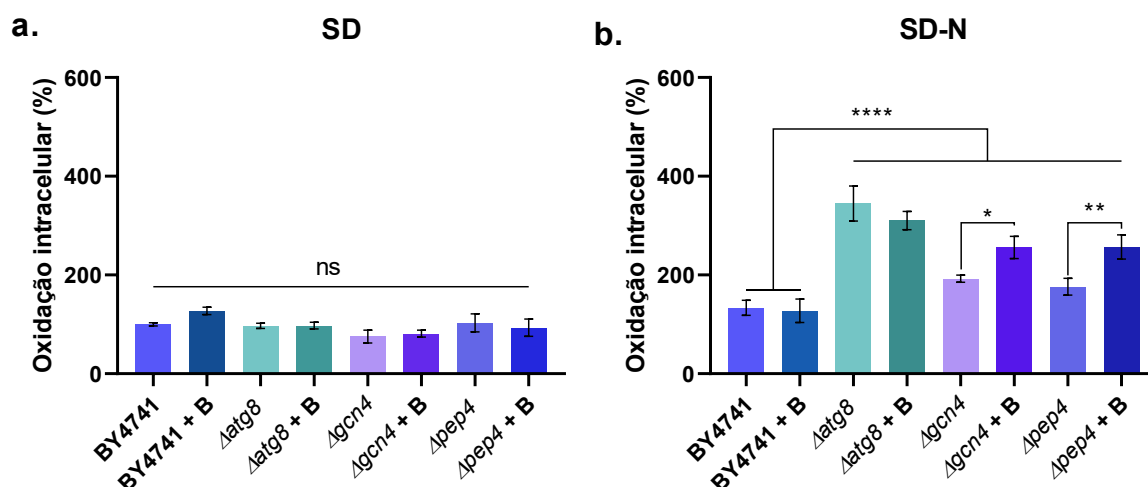


Figura 31: Oxidação intracelular da cepa BY4741 e das cepas mutantes na autofagia ($\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$) tratadas com 100 μ M de butirato de sódio após 24 h. Níveis de espécies reativas em células das cepas BY4741, $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ tratadas com butirato (B) mantidas nos meios suplementado por aminoácidos (SD) (a) e com restrição de nitrogênio (SD-N) (b). Análise estatística: One Way Anova (ns - não significativo para $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$).

Ao analisar os resultados, notou-se que, assim como anteriormente, há uma diferença nos níveis de oxidação intracelular entre os meios de cultivo. No meio SD, o resultado permaneceu semelhante ao obtido em 4 h, onde a exposição à solução aquosa de butirato de sódio não alterou os níveis de oxidação intracelular em nenhuma das cepas (**Figura 31a**).

Sob indução da autofagia por privação de nitrogênio (**Figura 31b**), a exposição ao butirato não variou os níveis de oxidação intracelular nas cepas controle (BY4741) e $\Delta atg8$. As cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ foram as únicas a serem influenciadas pelo butirato durante a indução da autofagia, apresentando um aumento nos níveis de oxidação intracelular de cerca de 33 % e 46 %, respectivamente, quando comparadas às suas respectivas cepas não tratadas. Dentre todas as cepas, a BY4741 manteve o menor nível de oxidação intracelular, sendo aproximadamente duas vezes menor que as cepas mutantes. Contudo, essa cepa apresentou um aumento de cerca de 45 % em seus próprios níveis de oxidação intracelular quando comparada ao seu estado em 4 h.

O comportamento das cepas cultivadas em meio suplementado em aminoácidos (SD) por 24 h corrobora com a análise anterior realizada em 4 h. Ambas indicam que, em condições de abundância de nutrientes, a demanda pela indução do processo autofágico é menor, o que torna a ausência das proteínas Gcn4p, Atg8p e Pep4p que são importantes na via autofágica menos relevantes. No entanto, esse cenário muda quando há um estresse nutricional. Durante o estresse nutricional prolongado, a tendência observada em 4 h se inverte: a exposição ao tratamento com butirato resultou no aumento dos níveis de oxidação intracelular nas cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$; enquanto o efeito oxidativo que estava presente na cepa $\Delta atg8$ em 4 h desapareceu.

O comportamento observado nas células de $\Delta atg8$ em ambos os períodos de tempo sugere uma resposta inicial ao estresse seguida de adaptação e compensação celular. Mitocôndrias disfuncionais apresentam uma redução na síntese de ATP e um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro da própria organela, ocasionada por diversos fatores tais como o acúmulo de NADH (Aran *et al.*, 2023; Murphy, 2013). Em células deficientes em Atg8p, a incapacidade de formar autofagossomos impede a degradação imediata de organelas danificadas, como as mitocôndrias, que por sua vez, permanecem no citoplasma (Ichimiya *et al.*, 2020).

Dada essa falha na mitofagia, a cepa $\Delta atg8$ já possui mitocôndrias disfuncionais em condições basais. Quando o butirato é degradado e aproveitado pelo metabolismo energético, pode ocorrer um aumento imediato na produção de EROs (Tang *et al.*, 2011; Salimi *et al.*, 2017). Apesar dessas células possuírem um sistema de defesa antioxidante endógeno íntegro, essa perturbação inicial decorrente da adição do butirato, somada ao acúmulo preexistente de mitocôndrias disfuncionais, pode sobrecarregar esse sistema de defesa. No entanto, em um período mais prolongado, como em 24 h, é possível que a célula se adapte a esses estresses, estimulando a produção de mais enzimas antioxidantes, o que resulta na redução dos níveis de oxidação intracelular (Farrugia *et al.*, 2012). Essa redução de cerca de 43 % entre 4 e 24 h indica uma possível resposta adaptativa ao estresse inicial.

A influência do butirato nos níveis oxidação intracelular das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ sugere que os danos ocasionados pela elevação da oxidação intracelular podem não ser imediatos, como observado em $\Delta atg8$, mas se desenvolvem com o tempo. Como já mencionado, a Gcn4p é um fator de transcrição importante para a

regulação de genes de proteínas autofágicas e enzimas antioxidantes (Gulias *et al.*, 2023). Na ausência de Gcn4p, as células podem ativar vias compensatórias, como a via transducional de sinal Msn2p/Msn4p para responder ao estresse metabólico. Essas vias auxiliam na resposta ao estresse oxidativo através da ativação de genes relacionados a defesas antioxidantes, resultando em uma redução dos níveis de oxidação intracelular a longo prazo (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010; Farrugia *et al.*, 2012). Isso justificaria a diminuição de aproximadamente 28 % na oxidação observada na cepa $\Delta gcn4$ não tratada entre 4 e 24 h.

Em contrapartida, em um período mais prolongado a exposição ao butirato parece ter um efeito inverso na cepa $\Delta gcn4$, aumentando em cerca de 7 % os níveis de oxidação intracelular entre 4 e 24 h. Isso pode ser atribuído à metabolização do butirato e à disfunção mitocondrial presente nessas células mesmo em condições basais. Sem Gcn4p, há um prejuízo na transcrição de genes essenciais para a etapa inicial da autofagia, impedindo a degradação de mitocôndrias disfuncionais (Gulias *et al.*, 2023). Em um curto período de tempo como 4 h, a metabolização do butirato pode, de fato, elevar os níveis de oxidação intracelular. No entanto, os mecanismos de defesa antioxidante basais das células, mesmo que enfraquecidos, podem ser capazes de lidar com esse aumento inicial provocado pelo butirato (Lacroux *et al.*, 2022). Todavia, a exposição prolongada ao butirato e o acúmulo contínuo de mitocôndrias disfuncionais não degradadas no citoplasma podem levar a uma elevação da oxidação intracelular que excede a capacidade dos mecanismos antioxidantes (Klionsky *et al.*, 2021; Gallis *et al.*, 2011; Shefa *et al.*, 2019). Essa combinação, associada à metabolização do butirato, pode induzir a longo prazo produção e acúmulo exacerbado de EROs, culminando na sobrecarga do sistema antioxidante e no aumento observado dessas espécies na cepa $\Delta gcn4$ durante a exposição prolongada ao butirato.

Células da cepa $\Delta pep4$ acumulam naturalmente autofagossomos devido à inativação de proteases e hidrolases essenciais, já que a ausência de Pep4p impossibilita a ativação dessas enzimas e a continuidade do processo degradativo (Button *et al.*, 2017). Esse acúmulo, por si só, pode induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois mitocôndrias danificadas permanecem sem ser degradadas, mesmo quando envoltas por autofagossomo, e continuam a produzir EROs (Yun *et al.*, 2020; Ichimiya *et al.*, 2020). No entanto, essas espécies

atuam como moléculas sinalizadoras, ativando cascatas de sinalização que impulsionam a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante (Wrzaczek *et al.*, 2013; Farrugia *et al.*, 2012). Esse mecanismo compensatório poderia atenuar o estresse metabólico ocasionado pelas EROs. Como resultado dessa sinalização eficaz, observa-se uma redução nos níveis de oxidação intracelular na cepa $\Delta pep4$ após 24 h em comparação com o período de 4 h.

Como já discutido, a exposição ao butirato estimula tanto o metabolismo energético quanto o processo autofágico, por meio das vias de sinalização AMPK/TORC1 e a PI3K/Akt/TORC1. Em células da cepa $\Delta pep4$, ambos os processos decorrentes da metabolização do butirato podem intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A indução do processo autofágico pelo butirato pode aumentar a geração de ATP, um recurso fundamental para a formação do autofagossomo (Mandic *et al.*, 2024; Huang *et al.*, 2002). No entanto, sem a degradação funcional, as mitocôndrias danificadas acumulam-se dentro dos autofagossomos e do citoplasma. Isso gera um ciclo vicioso, pois mais autofagossomos são demandados no citoplasma para iniciar um processo de degradação falho. A produção de EROs pelas mitocôndrias disfuncionais durante esse processo, a curto prazo (4 h), pode ser controlada por defesas antioxidantes endógenas, fruto de uma resposta compensatória a esse aumento do nível oxidativo. Contudo, essas defesas são limitadas, principalmente pela limitação nutricional. Sob períodos prolongados, a sobrecarga do sistema antioxidante pode levar a um aumento do nível oxidativo no interior das células (van der Pol *et al.*, 2019). Isso reflete-se no aumento nos níveis de oxidação intracelular na cepa $\Delta pep4$ exposta ao butirato de sódio entre 4 e 24 h, indicando um agravamento do estresse oxidativo das células.

O aumento dos níveis de EROs nas cepas de $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ expostas ao butirato também pode ser explicado pela intensificação do estresse do retículo endoplasmático (RE). A literatura científica demonstra que a disfunção mitocondrial, uma condição já observada anteriormente nas cepas mutantes de autofagia pela presença de colônias *petite*, pode induzir a supressão do sistema de degradação associado ao RE (Leadsham *et al.*, 2013). Esse processo, por sua vez, leva ao acúmulo da enzima NADPH oxidase (Yno1p), resultando em uma produção excessiva de EROs. A longo prazo, o acúmulo dessas espécies pode sobrecarregar as defesas antioxidantes, culminando no encurtamento da vida útil replicativa das leveduras (Ayer

et al., 2014). No entanto, a presença do butirato pode agravar o estresse do RE ao estar associada a um aumento nos níveis de cálcio intracelular (Zhang *et al.*, 2016). Essa alteração de fluxo de cálcio contribui para a acumulação de proteínas mal dobradas, o que induz a ativação da resposta a proteínas não dobradas (UPR). Contudo, a eficácia dessa resposta é comprometida nas células de $\Delta gcn4$, uma vez que esse fator de transcrição em conjunto com outros, como Hac1p, desempenha um papel essencial na regulação da via UPR (Patil *et al.*, 2004). Já nas células de $\Delta pep4$, o aumento dos níveis de cálcio pode promover a iniciação da via autofágica. Esse processo ocorre por meio da ativação de quinases como a AMPK, que inibe a via TOR e inicia autofagia (Zhang *et al.*, 2016). Esse estímulo adicional, sem degradação eficiente, acentua ainda mais o acúmulo de autofagossomos. Em ambas as cepas, o estresse crônico do RE agrava progressivamente o estresse oxidativo, explicando o aumento dos níveis de oxidação intracelular mais pronunciados dessas cepas após 24 h.

O contraste entre o aumento dos níveis de oxidação intracelular das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ e a adaptação da cepa $\Delta atg8$ após 24 h revela uma falha na resposta celular ao estresse. A incapacidade de células $\Delta gcn4$ em ativar uma resposta eficaz ao estresse e de células de $\Delta pep4$ de promover a degradação de autofagossomos de modo eficiente torna-as inaptas de se adaptarem ao estresse nutricional combinado com a exposição ao butirato. A consequência dessa falha resultou na redução na viabilidade celular e no aumento da formação de colônias *petite* após 24 h. A presença dessas colônias *petite* indicam perda da função respiratória, que está relacionada a disfunção mitocondrial. Esse comportamento ressalta a importância das vias de resposta ao estresse e de degradação autofágica para a sobrevivência celular a longo prazo, algo não observado na cepa $\Delta atg8$.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi demonstrado que o butirato, em baixa concentração, pode impactar tanto a via autofágica quanto outras vias de estresse metabólico em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa resposta das células ao composto mostrou-se dependente de proteínas do sistema autofágico, sendo mais pronunciada nas células mutantes em $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$. Inicialmente, constatou-se que as concentrações entre 50 e 200 μM não foram citotóxicas para as células de levedura com o processo autofágico íntegro em condições nutricionais favoráveis. A concentração de 100 μM foi selecionada com base na literatura científica, que aponta seu potencial em promover a homeostase celular, entre eles a depuração celular. Essa concentração foi utilizada nas cepas mutantes de $\Delta atg8$, $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$, onde constatou-se que a atividade metabólica foi reduzida somente nas cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$, em contraste com o controle tratado com butirato. No entanto, permaneceu a necessidade de investigar se esse padrão de resposta seria observado também mediante indução autofágica.

Ao investigar a influência do butirato nos mecanismos autofágicos, notou-se que, sob indução da autofagia por privação de nitrogênio as proteínas Gcn4p ou Pep4p mostraram-se necessárias para a modulação de uma resposta adaptativa ao estresse ocasionado pela exposição prolongada ao butirato. A ausência dessas proteínas em células $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$ resultou em uma maior vulnerabilidade à exposição ao composto, refletindo-se em uma redução da viabilidade celular em resposta à autofagia induzida, e simultaneamente, no aumento da formação de colônias *petite*, que estão associadas a uma perda da função respiratória. Esse efeito pode ser um resultado da elevação dos níveis de oxidação intracelular ao longo do tempo nessas células após a exposição ao butirato, o que foi observado nessas células.

Esses resultados indicam que a metabolização do butirato, sob estresse nutricional e indução da autofagia, demanda a presença do fator de transcrição Gcn4p, para mediar a expressão de genes importantes tanto no processo autofágico quanto para a resposta geral ao estresse metabólico. A funcionalidade da degradação vacuolar mediada pela Pep4p, proteína responsável pela ativação de importantes proteases envolvidas nesse processo, também mostrou-se relevante frente a metabolização do butirato. Ambas as deleções genéticas, de *GCN4* e *PEP4*, tornaram

as células mais sensíveis ao estresse promovido pelo butirato, destacando a importância dessas proteínas para o manejo do estresse metabólico e para a manutenção da saúde mitocondrial; que pareceu mais disfuncional mediante a exposição ao butirato, refletindo em um aumento de colônias *petite* e dos níveis de oxidação intracelular. Em um curto período de tempo, essa exposição pareceu ser atenuada por vias compensatórias. No entanto, o estresse metabólico acumulado durante uma exposição prolongada ao butirato exacerbou-se, resultando na redução da viabilidade das cepas $\Delta gcn4$ e $\Delta pep4$.

A cepa $\Delta atg8$ apresentou um aumento inicial na oxidação intracelular quando exposta ao butirato em um curto período de tempo. Contudo, essa elevação não se manteve em exposições mais prolongadas e, mais importante, resultou na perda de viabilidade ou aumento de colônias *petite*. Esse achado sugere que, embora a metabolização do butirato por células que não possuem a proteína Atg8p, importante na formação do autofagossomo, possa inicialmente perturbar seu estado redox, mecanismos compensatórios podem atenuar esse estresse adicional ao longo do tempo. Consequentemente, a inibição completa da autofagia, devido a incapacidade de formar autofagossomo em leveduras, pode impedir a influência do butirato sobre o fluxo autofágico.

Por fim, este estudo demonstra que a influência do butirato no metabolismo autofágico em células de *Saccharomyces cerevisiae* depende da presença de proteínas cruciais no processo autofágico, como Gcn4p e Pep4p. Essas proteínas mostraram-se essenciais para a tolerância e manutenção da viabilidade celular sob estresse combinado de butirato e indução autofágica, o que ocasiona implicações para a saúde mitocondrial e o estresse oxidativo. No entanto, sua influência sobre o fluxo autofágico parece estar intrinsecamente ligada à formação do autofagossomo, visto que, na ausência de Atg8p, seu efeito sobre a autofagia não é perceptível.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, H. M. et al. Benefits of dietary butyric acid, sodium butyrate, and their protected forms in aquafeeds: a review. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 28, n. 4, p. 421-448, 2020. DOI: Disponível em: 10.1080/23308249.2020.1758899.

ADOM, D.; NIE, D. Regulation of Autophagy by Short Chain Fatty Acids in Colon Cancer Cells. In: **Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?** [S. l.]: IntechOpen, 2013. DOI: 10.5772/54999.

ALAO, J. P. et al. Interplays of AMPK and TOR in Autophagy Regulation in Yeast. **Cells**, Basel, v. 12, n. 4, p. 519, 4 fev. 2023. DOI: 10.3390/cells12040519.

ALBRECHT, G. et al. Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 12696-702, 22 maio 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.21.12696.

ALERS, S. et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 1, p. 2-11, jan. 2012. DOI: 10.1128/MCB.06159-11.

ALUGOJU, P. et al. Quercetin Protects Yeast *Saccharomyces cerevisiae* pep4 Mutant from Oxidative and Apoptotic Stress and Extends Chronological Lifespan. **Current Microbiology**, v. 75, p. 519-530, 2018. DOI: 10.1007/s00284-017-1412-x.

AN, Z. et al. Autophagy is required for G₁/G₀ quiescence in response to nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Autophagy**, v. 10, n. 10, p. 1702-11, 2014. DOI: 10.4161/auto.32122.

ARAN, K. R.; SINGH, S. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Aging and Health Research**, v. 3, n. 4, p. 100169, 2023. DOI: 10.1016/j.ahr.2023.100169.

ASLANTÜRK, Ö. S. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. IntechOpen, 2018. v. 2, p. 64-80. DOI: 10.5772/intechopen.71923.

ASSAD, M.; JACKSON, N. Biocompatibility Evaluation of Orthopedic Biomaterials and Medical Devices: A Review of Safety and Efficacy Models. In:

Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier, 2019. p. 281-309. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11104-3.

ATICI, A. E.; CROTHER, T. R.; NOVAL RIVAS, M. Mitochondrial quality control in health and cardiovascular diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1290046, 6 nov. 2023. DOI: 10.3389/fcell.2023.1290046.

AUFSCHNAITER, A. et al. The Coordinated Action of Calcineurin and Cathepsin D Protects Against α -Synuclein Toxicity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 207, 2017. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00207.

AYER, A.; GOURLAY, C. W.; DAWES, I. W. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 60-72, 2014. DOI: 10.1111/1567-1364.12114.

BAKULA, D.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 239, 15 abr. 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00239.

BHARADWAJ, P. R.; MARTINS, R. N. Autophagy modulates A β accumulation and formation of aggregates in yeast. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 104, p. 103466, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.mcn.2020.103466.

BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.07.025.

BHATIA, S. Chapter 2 – Plant Tissue Culture. In: BHATIA, S.; KADAM, D. (ed.). **Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**. [S. l.]: Academic Press, 2015. p. 31-107. DOI: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, jan. 2012. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

BOUTOUJA, F. et al. Vps10-mediated targeting of Pep4 determines the activity of the vacuole in a substrate-dependent manner. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10557, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-47184-7.

BUTTON, R. W. et al. Accumulation of autophagosomes confers cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 33, p. 13599-13614, 2017. DOI: 10.1074/jbc.M117.782276.

CARMONA-GUTIERREZ, D. et al. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, p. 763-773, 2010. DOI: 10.1038/cdd.2009.219.

CARMONA-GUTIÉRREZ, D. et al. The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. **Cell Death & Disease**, v. 2, n. 5, p. 161, 2011. DOI: 10.1038/cddis.2011.43.

CARRETTA, M. D. et al. Butyric acid stimulates bovine neutrophil functions and potentiates the effect of platelet activating factor. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 176, p. 18-27, 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.05.002.

CARRETTA, M. D. et al. Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 662739, 8 abr. 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.662739.

CASTRO, P. R. et al. GPR43 regulates sodium butyrate-induced angiogenesis and matrix remodeling. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 320, n. 3, p. H1066-H1079, 1 mar. 2021. DOI: 10.1152/ajpheart.00515.2019.

CAZZANELLI, G. et al. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and their Role in Human Tumorigenesis. **Cells**, Basel, v. 7, n. 2, p. 14, 2018. DOI: 10.3390/cells7020014.

CEBOLLERO, E.; REGGIORI, F. Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1793, n. 9, p. 1413-21, set. 2009. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.008.

CHAKRABARTI, M. et al. Anti-tumor activities of luteolin and silibinin in glioblastoma cells: overexpression of miR-7-1-3p augmented luteolin and silibinin to inhibit autophagy and induce apoptosis in glioblastoma in vivo. **Apoptosis**, v. 21, n. 3, p. 312-28, 2016. DOI: 10.1007/s10495-015-1198-x.

CHALHOUB, N.; BAKER, S. J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 127-150, 2009. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.

CHANG, N. C. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 138, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00138.

CHEN, J. et al. Role of ATG7-dependent non-autophagic pathway in angiogenesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1266311, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1266311.

CHEN, J.; VITETTA, L. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. **Immune Network**, v. 20, n. 2, p. e15, 4 fev. 2020. DOI: 10.4110/in.2020.20.e15.

CHEN, Y. et al. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1040-52, 2009. DOI: 10.1038/cdd.2009.49.

CHIANG, C. J. et al. In situ delivery of biobutyrate by probiotic *Escherichia coli* for cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18172, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-97457-3.

CHILD, H. T. et al. Distinct roles for different autophagy-associated genes in the virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 163, p. 103748, nov. 2022. DOI: 10.1016/j.fgb.2022.103748.

CLARK, A.; MACH, N. The Crosstalk between the Gut Microbiota and Mitochondria during Exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 319, 19 maio 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00319.

COCSETTI, P.; NICASTRO, R.; TRIPODI, F. Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 5, n. 11, p. 482-494, 29 set. 2018. DOI: 10.15698/mic2018.11.655.

COLLIER, J. J. et al. Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 25, p. 2406-2417, 24 jun. 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa1915722.

COLOMBO, A. V. et al. Microbiota-derived short chain fatty acids modulate microglia and promote A β plaque deposition. **eLife**, v. 10, p. e59826, 13 abr. 2021. DOI: 10.7554/eLife.59826.

CORTHALS, A. P. Multiple sclerosis is not a disease of the immune system. **The Quarterly Review of Biology**, v. 86, n. 4, p. 287-321, dez. 2011. DOI: 10.1086/662453.

DAS, S. et al. ATP Citrate Lyase Regulates Myofiber Differentiation and Increases Regeneration by Altering Histone Acetylation. **Cell Reports**, v. 21, n. 11, p. 3003-3011, 12 dez. 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.038.

DATAN, E. et al. Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 3, p. e2127, 2016. DOI: 10.1038/cddis.2015.409.

DE GAETANO, A. et al. Mitophagy and Oxidative Stress: The Role of Aging. **Antioxidants**, Basel, v. 10, n. 5, p. 794, 2021. DOI: 10.3390/antiox10050794.

DE MENDOZA, A.; SEBÉ-PEDRÓS, A.; RUIZ-TRILLO, I. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 606-19, mar. 2014. DOI: 10.1093/gbe/evu038.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2006. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001.

DELORME-AXFORD, E. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. **Methods**, v. 75, p. 3-12, 2015. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.12.008.

DEMARQUOY, J.; LE BORGNE, F. Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 301-9, 26 nov. 2015. DOI: 10.4331/wjbc.v6.i4.301.

DETER, R. L.; BAUDHUIN, P.; DE DUVE, C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. **Journal of Cell Biology**, v. 35, n. 2, p. C11-6, nov. 1967. DOI: 10.1083/jcb.35.2.c11.

DING, Y. et al. Sodium Butyrate Induces Mitophagy and Apoptosis of Bovine Skeletal Muscle Satellite Cells through the Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 17, p. 13474, 2023. DOI: 10.3390/ijms241713474.

DO NASCIMENTO, R. P. et al. **Microbiologia Industrial: Bioprocessos**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2018.

DOBLADO, L. et al. Mitophagy in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 8, p. 3903, 2021. DOI: 10.3390/ijms22083903.

DONOHUE, D. R. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517-26, 4 maio 2011. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.

DONOHUE, D. R. et al. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. **Molecular Cell**, v. 48, n. 4, p. 612-26, 30 nov. 2012. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.08.033.

ECKER, N. et al. Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 879-90, 2010. DOI: 10.4161/auto.6.7.12753.

EPHRUSSI, B.; SLONIMSKI, P. Yeast Mitochondria: Subcellular Units involved in the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast. **Nature**, v. 176, p. 1207-1208, 1955. DOI: 10.1038/1761207b0.

EPSTEIN, C. B. et al. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 2, p. 297-308, 2001. DOI: 10.1091/mbc.12.2.297.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In: ARMSTRONG, D. (ed.). **Advanced Protocols in Oxidative Stress II**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 594, p. 43-52. (Methods in Molecular Biology). DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.

EVANS, M. et al. Combined effects of starvation and butyrate on autophagy-dependent gingival epithelial cell death. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 3, p. 522-531, jun. 2017. DOI: 10.1111/jre.12418.

FAI, P. B. et al. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1165-70, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.078.

FARRÉ, J. C.; SUBRAMANI, S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 537-52, set. 2016. DOI: 10.1038/nrm.2016.74.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 64, 20 jun. 2012. DOI: 10.3389/fonc.2012.00064.

FEHER, J. J. ATP Production III: Fatty Acid Oxidation and Amino Acid Oxidation. In: FEHER, J. J. **Quantitative Human Physiology: An Introduction**. Burlington, MA: Academic Press, 2012. p. 191-201. DOI: 10.1016/B978-0-12-800883-6.00022-7.

FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 24-41, jan. 2014. DOI: 10.1038/cr.2013.168.

FRAIBERG, M.; ELAZAR, Z. Genetic defects of autophagy linked to disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 172, p. 293-323, 2020. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2020.04.001.

FRANSEN, M.; LISMONT, C.; WALTON, P. The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1126, 24 maio 2017. DOI: 10.3390/ijms18061126.

GALLIS, J. L. et al. A metabolic link between mitochondrial ATP synthesis and liver glycogen metabolism: NMR study in rats re-fed with butyrate and/or glucose. **Nutrition & Metabolism (London)**, v. 8, p. 38, 2011. DOI: 10.1186/1743-7075-8-38.

GAO, Y.; TIAN, T. mTOR Signaling Pathway and Gut Microbiota in Various Disorders: Mechanisms and Potential Drugs in Pharmacotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 14, p. 11811, 2023. DOI: 10.3390/ijms241411811.

GEORGE, M. D. et al. Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 3, p. 969-82, mar. 2000. DOI: 10.1091/mbc.11.3.969.

GERHAUSER, C. Impact of dietary gut microbial metabolites on the epigenome. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, p. 20170359, 2018. DOI: 10.1098/rstb.2017.0359.

GIAMPIERI, F. et al. Autophagy in Human Health and Disease: Novel Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, p. 577-634, 2019. DOI: 10.1089/ars.2017.7234.

GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 33, 20 fev. 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00033.

GIORGI, C. et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. In: **International Review of Cell and Molecular Biology**. London: Academic Press, 2018. v. 340, p. 209-344.

GIROMINI, C. et al. Role of short chain fatty acids to counteract inflammatory stress and mucus production in human intestinal HT29-MTX-E12 cells. **Foods**, Basel, v. 11, n. 13, p. 1983, 2022. DOI: 10.3390/foods11131983.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3-12, maio 2010. DOI: 10.1002/path.2697.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996. DOI: 10.1126/science.274.5287.546.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010. DOI: 10.53393/rial.2010.v69.32682.

GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 366-384, 2010. DOI: 10.1017/S0954422410000247.

GUINN, L.; LO, E.; BALÁZSI, G. Drug-dependent growth curve reshaping reveals mechanisms of antifungal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Communications Biology**, v. 5, p. 292, 2022. DOI: 10.1038/s42003-022-03228-9.

GULIAS, J. F. et al. Gcn4 impacts metabolic fluxes to promote yeast chronological lifespan. **PLoS ONE**, v. 18, n. 10, p. e0292949, 13 out. 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0292949.

HAMPE, J. et al. Genome-Wide Association Scan of Nonsynonymous Snps Identifies a Susceptibility Variant for Crohn Disease in Atg16l1. **Nature Genetics**, v. 39, p. 207-211, 2007. DOI: 10.1038/ng1954.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 251-62, 22 mar. 2012. DOI: 10.1038/nrm3311.

HATAYAMA, H. et al. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 3, p. 599-603, 11 maio 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.025.

HE, L. et al. Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 493-504, 1 jul. 2018. DOI: 10.1093/advances/nmy011.

HECHT, K. A.; O'DONNELL, A. F.; BRODSKY, J. L. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. **Cellular Logistics**, v. 4, n. 1, p. e28023, 1 jan. 2014. DOI: 10.4161/cl.28023.

HESS, D. C. et al. Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, p. e1000407, mar. 2009. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000407.

HILL, J. M. et al. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 5, p. 43, 2014. DOI: 10.3389/fneur.2014.00043.

HINNEBUSCH, A. G.; NATARAJAN, K. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 1, p. 22-32, fev. 2002. DOI: 10.1128/EC.01.1.22-32.2002.

HO, L. et al. Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms.

Expert Review of Neurotherapeutics, v. 18, p. 83-90, 2018. DOI: 10.1080/14737175.2018.1400909.

HONG, Y. et al. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. **Antioxidants**, Basel, v. 13, n. 3, p. 312, 1 mar. 2024. DOI: 10.3390/antiox13030312.

HOUTEN, S. M. et al. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p. 23-44, 2016. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045.

HU, S. et al. Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 4, p. 1542, 24 fev. 2020. DOI: 10.3390/ijms21041542.

HUANG, W. et al. Sodium butyrate induces autophagic apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting AKT/mTOR signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 514, n. 1, p. 64-70, 18 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.111.

HUANG, W. P.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. **Cell Structure and Function**, v. 27, n. 6, p. 409-20, dez. 2002. DOI: 10.1247/csf.27.409.

IACONO, K. T. et al. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 83, n. 3, p. 283-95, dez. 2007. DOI: 10.1016/j.yexmp.2007.08.014.

ICHIMIYA, T. et al. Autophagy and Autophagy-Related Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 23, p. 8974, 2020. DOI: 10.3390/ijms21238974.

IKSEN; POTHONGSRISIT, S.; PONGRAKHANANON, V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 13, p. 4100, 5 jul. 2021. DOI: 10.3390/molecules26134100.

INOUE, Y.; KLIONSKY, D. J. Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 7, p. 664-70, set. 2010. DOI: 10.1016/j.semcdb.2010.03.009.

IRNIGER, S.; BRAUS, G. H. Controlling transcription by destruction: the regulation of yeast Gcn4p stability. **Current Genetics**, v. 44, p. 8-18, 2003. DOI: 10.1007/s00294-003-0422-3.

JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K. L. Amino acid signalling upstream of mTOR. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 133-9, mar. 2013. DOI: 10.1038/nrm3522.

JIANG, M.; LI, Z.; ZHU, G. The role of autophagy in the pathogenesis of periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 26, n. 2, p. 259-269, mar. 2020. DOI: 10.1111/odi.13045.

JIANG, W. et al. Dual effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 6235-42, maio 2012. DOI: 10.1007/s11033-011-1443-5.

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 338-45, 17 jan. 2013. DOI: 10.1038/nature11861.

JONES, E. W.; ZUBENKO, G. S.; PARKER, R. R. PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 102, n. 4, p. 665-77, dez. 1982. DOI: 10.1093/genetics/102.4.665.

JUÁREZ-MONTIEL, M. et al. Vacuolar proteases and autophagy in phytopathogenic fungi: A review. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 948477, 26 out. 2022. DOI: 10.3389/ffunb.2022.948477.

KAMILOĞLU BEŞTEPE, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332-349, 2020. DOI: 10.1002/fft2.44.

KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Protein Homeostasis and Aging. In: MASORO, E. J.; AUSTAD, S. N. (ed.). **Handbook of the Biology of Aging**. 7. ed. Waltham, MA, USA: Academic Press, 2011. cap. 13, p. 297-317. DOI: 10.1016/b978-0-12-378638-8.00013-0.

KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA, K. et al. Sodium butyrate in both prevention and supportive treatment of colorectal cancer. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1023806, 26 out. 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1023806.

KERSTENS, W.; VAN DIJCK, P. A Cinderella story: how the vacuolar proteases Pep4 and Prb1 do more than cleaning up the cell's mass degradation processes. **Microbial Cell**, v. 5, n. 10, p. 438-443, 18 ago. 2018. DOI: 10.15698/mic2018.10.650.

KHANDIA, R. et al. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. **Cells**, Basel, v. 8, n. 7, p. 674, 3 jul. 2019. DOI: 10.3390/cells8070674.

KIM, K. et al. O-GlcNAc modification of leucyl-tRNA synthetase 1 integrates leucine and glucose availability to regulate mTORC1 and the metabolic fate of leucine. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2904, 25 maio 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-30696-8.

KIM, M. et al. Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. **eLife**, v. 5, p. e12245, 26 jan. 2016. DOI: 10.7554/eLife.12245.

KIM, M. S. et al. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. **APMIS**, v. 119, n. 11, p. 802-7, nov. 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2011.02812.x.

KING, J. S. Autophagy across the eukaryotes: is *S. cerevisiae* the odd one out? **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1159-62, 1 jul. 2012. DOI: 10.4161/auto.20527.

KITADA, M.; KOYA, D. Autophagy in metabolic disease and ageing. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 11, p. 647-661, nov. 2021. DOI: 10.1038/s41574-021-00551-9.

KLIONSKY, D. J. et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Developmental Cell**, v. 5, n. 4, p. 539-45, out. 2003. DOI: 10.1016/s1534-5807(03)00296-x.

KLIONSKY, D. J. et al. Autophagy in major human diseases. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 19, p. e108863, 1 out. 2021. DOI: 10.15252/emboj.2021108863.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1-382, 2021. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.

KLIONSKY, D. J.; ESKELINEN, E. L. The vacuole vs. the lysosome: When size matters. **Autophagy**, v. 10, n. 2, p. 185-187, 2013. DOI: 10.4161/auto.27367.

KOURTIS, N.; TAVERNAKRAKIS, N. Autophagy and cell death in model organisms. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 21-30, jan. 2009. DOI: 10.1038/cdd.2008.120.

KRAFT, C.; REGGIORI, F. Phagophore closure, autophagosome maturation and autophagosome fusion during macroautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 598, n. 1, p. 73-83, jan. 2024. DOI: 10.1002/1873-3468.14720.

KRASINSKAS, A. M.; GOLDSMITH, J. D. Chapter 14 - Immunohistology of the Gastrointestinal Tract. In: DABBS, D. J. (ed.). **Diagnostic Immunohistochemistry**. 3. ed. W.B. Saunders, 2011. p. 500-540. ISBN 9781416057666. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5766-6.00018-2.

KRISHNAMURTHI, V. R. et al. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245205, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0245205.

KUCHITSU, Y. et al. Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 7, p. jcs215442, 6 abr. 2018. DOI: 10.1242/jcs.215442.

LACROUX, J. et al. Proteomics unveil a central role for peroxisomes in butyrate assimilation of the heterotrophic Chlorophyte alga *Polytomella* sp. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1029828, 24 out. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1029828.

LE BORGNE, F.; DEMARQUOY, J. Interaction between peroxisomes and mitochondria in fatty acid metabolism. **Open Journal of Molecular and Integrative Physiology**, v. 2, n. 1, p. 27-33, 2012. DOI: 10.4236/ojmip.2012.21005.

LEADSHAM, J. E. et al. Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 279-286, 2013. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.07.005.

LEARY, K. A. et al. Characterization of Protein-Membrane Interactions in Yeast Autophagy. **Cells**, Basel, v. 11, n. 12, p. 1876, 2022. DOI: 10.3390/cells11121876.

LEE, J. S.; LEE, G. M. Effect of sodium butyrate on autophagy and apoptosis in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 2, p. 349-57, mar./abr. 2012. DOI: 10.1002/btpr.1512.

LEI, Y. et al. How Cells Deal with the Fluctuating Environment: Autophagy Regulation under Stress in Yeast and Mammalian Systems. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 2, p. 304, 2022. DOI: 10.3390/antiox11020304.

LEMUS, L. et al. Pep4-dependent microautophagy is required for post-ER degradation of GPI-anchored proteins. **Autophagy**, v. 18, n. 1, p. 223-225, 2022. DOI: 10.1080/15548627.2021.1971929.

LENGGER, B.; JENSEN, M. K. Engineering G protein-coupled receptor signalling in yeast for biotechnological and medical purposes. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 1, p. foz087, 1 fev. 2020. DOI: 10.1093/femsyr/foz087.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. **Cell**, v. 176, n. 1-2, p. 11-42, 10 jan. 2019. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048.

LI, L. et al. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses DNA double strand break repair induced by etoposide more effectively in MCF-7 cells than in HEK293 cells. **BMC Biochemistry**, v. 16, p. 2, 2015. DOI: 10.1186/s12858-014-0030-5.

LI, S. J. et al. Wogonin induces Beclin-1/PI3K and reactive oxygen species-mediated autophagy in human pancreatic cancer cells. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 5059-5067, 2016. DOI: 10.3892/ol.2016.5367.

LI, W. et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. **Science China Life Sciences**, v. 60, p. 1223-33, 2017. DOI: 10.1007/s11427-016-9001-4.

LI, X. et al. Sodium Butyrate Ameliorates Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelium Barrier Injury and Mitochondrial Damage through AMPK-Mitophagy Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2022, p. 3745135, 29 jan. 2022. DOI: 10.1155/2022/3745135.

LI, Y. et al. Novel and functional ATG12 gene variants in sporadic Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 643, p. 22-26, 16 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.028.

LI, Y. et al. The GCN4 Transcription Factor: A Review of Its Functional Progress in Fungi. **Horticulturae**, v. 10, p. 1113, 2024. DOI: 10.3390/horticulturae10101113.

LIAN, L. et al. GCN4 Regulates Secondary Metabolism through Activation of Antioxidant Gene Expression under Nitrogen Limitation Conditions in *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 14, p. e0015621-21, 25 jun. 2021. DOI: 10.1128/AEM.00156-21.

LIPATOVA, Z. et al. Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 18, p. 6981-6986, 1 maio 2012. DOI: 10.1073/pnas.1121299109.

LIPINSKI, K. A.; KANIAK-GOLIK, A.; GOLIK, P. Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6-7, p. 1086-1098, jun./jul. 2010. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2009.12.019.

LIU, H. et al. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 21-29, 1 jan. 2018. DOI: 10.1093/advances/nmx009.

LIU, H. et al. Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 202, p. 202ra123, 11 set. 2013. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005864.

LIU, J. et al. Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide-1. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 381, p. 176-181, 2017. DOI: 10.1016/j.jns.2017.08.3235.

LIU, W. et al. From *Saccharomyces cerevisiae* to human: The important gene co-expression modules. **Biomedical Reports**, v. 7, n. 2, p. 153-158, ago. 2017. DOI: 10.3892/br.2017.941.

LIU, X. M. et al. Lipidation-independent vacuolar functions of Atg8 rely on its noncanonical interaction with a vacuole membrane protein. **eLife**, v. 7, p. e41237, 19 nov. 2018. DOI: 10.7554/eLife.41237.

LIU, Y. et al. The role of MUC2 mucin in intestinal homeostasis and the impact of dietary components on MUC2 expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 884-891, 1 dez. 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.191.

LONGO-SORBELLO, G. A. et al. Cytotoxicity and cell growth assays. In: **Cell biology**. San Diego, CA: Academic Press, 2006. p. 315-324. DOI: 10.1016/B978-012164730-8/50039-3.

LOU, M. et al. Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: In vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1-9, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.08.055.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29-41, jan. 2017. DOI: 10.1111/1462-2920.13589.

LU, K.; PSAKHYE, I.; JENTSCH, S. Autophagic Clearance of PolyQ Proteins Mediated by Ubiquitin-Atg8 Adaptors of the Conserved CUET Protein Family. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 549-563, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.048.

LUO, S. et al. Sodium butyrate induces autophagy in colorectal cancer cells through LKB1/AMPK signaling. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 53-63, fev. 2019. DOI: 10.1007/s13105-018-0651-z.

MAEDA, Y.; OKU, M.; SAKAI, Y. Autophagy-independent function of Atg8 in lipid droplet dynamics in yeast. **Journal of Biochemistry**, v. 161, n. 4, p. 339-348, 1 abr. 2017. DOI: 10.1093/jb/mvw078.

MANDIC, M. et al. No energy, no autophagy-Mechanisms and therapeutic implications of autophagic response energy requirements. **Journal of Cellular Physiology**, v. 239, n. 11, p. e31366, nov. 2024. DOI: 10.1002/jcp.31366.

MAO, K. et al. Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 31, p. E2875-E2884, 30 jul. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1300064110.

MARCHI, S. et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. **Journal of Signal Transduction**, 2012, p. 329635, 2012. DOI: 10.1155/2012/329635.

MARUYAMA, T. et al. Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, p. 583-593, 2021. DOI: 10.1038/s41594-021-00614-5.

MASCARENHAS, C. et al. Gcn4 is required for the response to peroxide stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 7, p. 2995-3007, jul. 2008. DOI: 10.1091/mbc.e07-11-1173.

MATTHEW, R. G.; GREIG, D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 3, p. fov009, maio 2015. DOI: 10.1093/femsyr/fov009.

MAYORGA-RAMOS, A. et al. Protective role of butyrate in obesity and diabetes: New insights. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1067647, 24 nov. 2022. DOI: 10.3389/fnut.2022.1067647.

MCCRORY, C.; LENARDON, M.; TRAVEN, A. Bacteria-derived short-chain fatty acids as potential regulators of fungal commensalism and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 1106-1118, nov. 2024. DOI: 10.1016/j.tim.2024.04.004.

MEAS, R.; BURAK, M. J.; SWEASY, J. B. DNA repair and systemic lupus erythematosus. **DNA Repair**, v. 56, p. 174-182, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.dnarep.2017.06.020.

MELHEM, H. et al. Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors Connect the Diet-Microbiota-Metabolites Axis to Inflammatory Bowel Disease. **Cells**, Basel, v. 8, n. 5, p. 450, 14 maio 2019. DOI: 10.3390/cells8050450.

METUR, S. P. et al. Regulation of autophagy gene expression and its implications in cancer. **Journal of Cell Science**, v. 136, n. 10, p. jcs260631, 15 maio 2023. DOI: 10.1242/jcs.260631.

METUR, S. P.; KLIONSKY, D. J. Nutrient-dependent signaling pathways that control autophagy in yeast. **FEBS Letters**, v. 598, n. 1, p. 32-47, jan. 2024. DOI: 10.1002/1873-3468.14741.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, n. 22, p. 2861-2873, 2007. DOI: 10.1101/gad.1599207.

MIZUSHIMA, N. The exponential growth of autophagy-related research: from the humble yeast to the Nobel Prize. **FEBS Letters**, v. 591, n. 5, p. 681-689, mar. 2017. DOI: 10.1002/1873-3468.12594.

MOHAMED, H. N.; EID, A. A. Gut microbiota and mTOR signaling: Insight on a new pathophysiological interaction. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 98-104, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.021.

MORI, H.; MASAYUKI, H. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 647-652, dez. 2013. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.028.

MOTA, M. N. et al. Shared and more specific genetic determinants and pathways underlying yeast tolerance to acetic, butyric, and octanoic acids. **Microbial Cell Factories**, v. 23, p. 71, 2024. DOI: 10.1186/s12934-024-02309-0.

MÜLLER, M. et al. The coordinated action of the MVB pathway and autophagy ensures cell survival during starvation. **eLife**, v. 4, p. e07736, 2015. DOI: 10.7554/eLife.07736.

MURPHY, M. P. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 145-146, 6 ago. 2013. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.07.006.

NADAL, M.; GOLD, S. E. The autophagy genes atg8 and atg1 affect morphogenesis and pathogenicity in *Ustilago maydis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 463-478, 2010. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00620.x.

NGUYEN, L. N. et al. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2573-2580, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkr358.

NIETO-TORRES, J. L. et al. Beyond Autophagy: The Expanding Roles of ATG8 Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 8, p. 673-686, 2021. DOI: 10.1016/j.tibs.2021.01.004.

NISHINO, I. et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). **Nature**, v. 406, n. 6798, p. 906-910, 24 ago. 2000. DOI: 10.1038/35022604.

NODA, T. Chapter 2: Viability assays to monitor yeast autophagy. **Methods in Enzymology**, v. 451, p. 27-32, 2008. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)03202-3.

NODA, T. Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. **Biomolecules**, v. 7, p. 52, 2017. DOI: 10.3390/biom7030052.

OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 9-23, jan. 2014. DOI: 10.1038/cr.2013.169.

OLIVARES-MARIN, I. K. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. **Journal of Visualized Experiments**, v. 139, p. 58192, 2018. DOI: 10.3791/58192.

OLIVEIRA, C. et al. Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria. **Cell Death & Disease**, v. 6, p. e1788, 2015. DOI: 10.1038/cddis.2015.157.

OLSEN, B.; MURAKAMI, C. J.; KAEBERLEIN, M. YODA: Software to facilitate high-throughput analysis of chronological life span, growth rate, and survival in budding yeast. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 141, 2010. DOI: 10.1186/1471-2105-11-141.

ONODERA, J.; OHSUMI, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31582-31586, 9 set. 2005. DOI: 10.1074/jbc.M506736200.

O'RIORDAN, K. J. et al. Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 546, p. 111572, 15 abr. 2022. DOI: 10.1016/j.mce.2022.111572.

ORNATOWSKI, W. et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. **Redox Biology**, v. 36, p. 101679, set. 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101679.

ÖZ-ARSLAN, D.; DURER, Z. A.; KAN, B. G protein-coupled receptor-mediated autophagy in health and disease. **British Journal of Pharmacology**, 19 mar. 2024. Publicação eletrônica antes da impressão. DOI: 10.1111/bph.16345.

PAKOS-ZEBRUCKA, K. et al. The integrated stress response. **EMBO Reports**, v. 17, n. 10, p. 1374-1395, out. 2016. DOI: 10.15252/embr.201642195.

PALIKARAS, K.; LIONAKI, E.; TAVERNAKRAKIS, N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, p. 1399-1401, 2015. DOI: 10.1038/cdd.2015.86.

PANDARATHODIYIL, A. K. et al. Autophagy: The "Pac-Man" within Us-Ally or Adversary? **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 22, n. 10, p. 1079-1081, 1 out. 2021. DOI: 10.5005/jp-journals-10024-3213.

PANT, K.; SARAYA, A.; VENUGOPAL, S. K. Oxidative stress plays a key role in butyrate-mediated autophagy via Akt/mTOR pathway in hepatoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 99-106, 1 ago. 2017. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.001.

PARK, B. O. et al. The Short-Chain Fatty Acid Receptor GPR43 Modulates YAP/TAZ via RhoA. **Molecular Cells**, v. 44, n. 7, p. 458-467, 31 jul. 2021. DOI: 10.14348/molcells.2021.0021.

PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. Vacuolar hydrolysis and efflux: current knowledge and unanswered questions. **Autophagy**, v. 15, n. 2, p. 212-227, 2018. DOI: 10.1080/15548627.2018.1545821.

PATIL, C. K.; LI, H.; WALTER, P. Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. **PLoS Biology**, v. 2, n. 8, p. E246, 2004. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020246.

PENG, L. et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 9, p. 1619-1625, 2009. DOI: 10.3945/jn.109.104638.

PEREIRA, C. et al. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1398-1410, jun. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07122.x.

PÉREZ-ESCUREDO, J. et al. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 10, p. 2481-2497, out. 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.013.

PETITI, J.; REVEL, L.; DIVIETO, C. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. **Biosensors (Basel)**, v. 14, n. 4, p. 156, 26 mar. 2024. DOI: 10.3390/bios14040156.

PIERZYNOWSKA, K. et al. Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 4, p. 989-1008, ago. 2018. DOI: 10.1007/s11011-018-0214-6.

PIRES, J. M. C. **Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio**. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de Évora, Évora, 2017. Disponível em: <https://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/21042>. Acesso em: 05 maio 2025.

PORTINCASA, P. et al. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1105, 20 jan. 2022. DOI: 10.3390/ijms23031105.

POSTNIKOFF, S. D. L.; JOHNSON, J. E.; TYLER, J. K. The integrated stress response in budding yeast lifespan extension. **Microbial Cell**, v. 4, n. 11, p. 368-375, 24 out. 2017. DOI: 10.15698/mic2017.11.597.

QI, Q. et al. An integrated undergraduate laboratory exercise to demonstrate microbial evolution: petite mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **The American Biology Teacher**, v. 86, n. 2, p. 101-107, 2024. DOI: 10.1525/abt.2024.86.2.101.

RAINA, K. et al. Energy deprivation by silibinin in colorectal cancer cells: a double-edged sword targeting both apoptotic and autophagic machineries. **Autophagy**, v. 9, n. 5, p. 697-713, 2013. DOI: 10.4161/auto.23960.

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. **Genetics**, v. 194, n. 2, p. 341-361, jun. 2013. DOI: 10.1534/genetics.112.149013.

ROGOV, V. et al. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. **Molecular Cell**, v. 53, n. 2, p. 167-178, 23 jan. 2014. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.

SALIMI, V. et al. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 208, 2 nov. 2017. DOI: 10.1186/s12944-017-0593-4.

SALVI, P. S.; COWLES, R. A. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1775, 14 jul. 2021. DOI: 10.3390/cells10071775.

SANDHIR, R. Metabolic pathways | Lipid metabolism. In: ROBINSON, R. K.; BATT, C. A. (ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. London: Academic Press, 1999. p. 1298-1312.

SCHNEIDER, J. L.; CUERVO, A. M. Autophagy and human disease: emerging themes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 26, p. 16-23, jun. 2014. DOI: 10.1016/j.gde.2014.04.003.

SHRIDHAR, S. et al. Ubiquitination and selective autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 1, p. 21-30, 2013. DOI: 10.1038/cdd.2012.72.

SHEFA, U. et al. Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 749-756, maio 2019. DOI: 10.4103/1673-5374.249218.

SHENTON, D.; GRANT, C. M. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 2, p. 513-519, set. 2003. DOI: 10.1042/bj20030508.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990-995, 5 nov. 2004. DOI: 10.1126/science.1099993.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 11, p. 25, 31 jan. 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00025.

SINGH, S.; SINGH, P. K.; KUMAR, A. Butyrate Ameliorates Intraocular Bacterial Infection by Promoting Autophagy and Attenuating the Inflammatory Response. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 1, p. e0025222, 24 jan. 2023. DOI: 10.1128/iai.00252-22.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Microbial growth kinetics. In: **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. [s. l.]: Elsevier, 2017. cap. 2, p. 21-74. DOI: 10.1016/B978-0-08-099953-1.00002-8.

STANLEY, R. E.; RAGUSA, M. J.; HURLEY, J. H. The beginning of the end: how scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 1, p. 73-81, jan. 2014. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.07.008.

STEFFEN, K. K. et al. Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 292-302, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.037.

STEIN, R. A.; RIBER, L. Epigenetic effects of short-chain fatty acids from the large intestine on host cells. **microLife**, v. 4, 2023. DOI: 10.1093/femsml/uqad032.

STEIN, S. C. et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. **Biochemical Journal**, v. 345, n. Pt 3, p. 437-443, 1 fev. 2000. DOI: 10.1042/bj3450437.

STODDART, M. J. Mammalian cell viability. In: **Methods in Molecular Biology**. [S. l.]: Humana Press, 2011. v. 740, p. 1-6. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6.

STOVALL, A. K. et al. A conserved Gcn2-Gcn4 axis links methionine utilization and the oxidative stress response in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 640678, mar. 2021. DOI: 10.3389/ffunb.2021.640678.

STRIJBIS, K.; DISTEL, B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 12, p. 1809-1815, dez. 2010. DOI: 10.1128/EC.00172-10.

STURGEON, C. M. et al. Kinetic assay of starvation sensitivity in yeast autophagy mutants allows for the identification of intermediary phenotypes. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 505, 2019. DOI: 10.1186/s13104-019-4545-0.

SUDHARSHAN, S. J. et al. Betulinic acid mitigates oxidative stress-mediated apoptosis and enhances longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. **Free Radical Research**, v. 56, n. 11-12, p. 699-712, 2022. DOI: 10.1080/10715762.2023.2166505.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GCPR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of Gastroenterology**, v. 52, p. 1-8, 2017. DOI: 10.1007/s00535-016-1242-9.

SUN, Q. et al. Defect of mitochondrial respiratory chain is a mechanism of ROS overproduction in a rat model of alcoholic liver disease: role of zinc deficiency. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 3, p. G205-G214, 1 fev. 2016. DOI: 10.1152/ajpgi.00270.2015.

SUZUKI, S. W.; ONODERA, J.; OHSUMI, Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17412, 25 fev. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017412.

TANG, Y. et al. Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 4, p. 602-618, abr. 2011. DOI: 10.1038/cdd.2010.117.

TORGGLER, R. et al. Assays to monitor autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cells**, v. 6, n. 3, p. 23, 2017. DOI: 10.3390/cells6030023.

TSOI, B. M. et al. Essential role of one-carbon metabolism and Gcn4p and Bas1p transcriptional regulators during adaptation to anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11205-11215, 24 abr. 2009. DOI: 10.1074/jbc.M809225200.

TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1-2, p. 169-174, 25 out. 1993. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80398-e.

TYLER, J. K. et al. The role of autophagy in the regulation of yeast life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1418, n. 1, p. 31-43, 2018. DOI: 10.1111/nyas.13549.

VÁCHOVÁ, L. et al. Differential stability of Gcn4p controls its cell-specific activity in differentiated yeast colonies. **mBio**, v. 15, n. 5, p. e0068924, 8 maio 2024. DOI: 10.1128/mbio.00689-24.

VAN DER POL, A. et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, v. 21, n. 4, p. 425-435, abr. 2019. DOI: 10.1002/ejhf.1320.

VANDERWAEREN, L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 11665, 2022. DOI: 10.3390/ijms231911665.

VASILJEVSKI, E. R. et al. Lipid storage myopathies: Current treatments and future directions. **Progress in Lipid Research**, v. 72, p. 1-17, out. 2018. DOI: 10.1016/j.plipres.2018.08.001.

VIJAY, N.; MORRIS, M. E. Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 10, p. 1487-1498, 2014. DOI: 10.2174/13816128113199990462.

VOWINCKEL, J. et al. The metabolic growth limitations of petite cells lacking the mitochondrial genome. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 11, p. 1521-1535, nov. 2021. DOI: 10.1038/s42255-021-00477-6.

WANG, F. et al. Sodium butyrate inhibits migration and induces AMPK-mTOR pathway-dependent autophagy and ROS-mediated apoptosis via the miR-139-5p/Bmi-1 axis in human bladder cancer cells. **The FASEB Journal**, 2020. DOI: 10.1096/fj.201902626r.

WANG, S. et al. Role of AMPK in autophagy. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1015500, 25 nov. 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.1015500.

WANG, X. et al. G protein-coupled receptors expressed and studied in yeast. The adenosine receptor as a prime example. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114370, 2021. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114370.

WEI, H. et al. Effect of Sex and Cross-Sex Hormone Treatment on Renal Monocarboxylate-Transporter Expression in Rats. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2404, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102404.

WEIS, W. I.; KOBILKA, B. K. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, p. 897-919, 20 jun. 2018. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910.

WEN, J. et al. Sodium butyrate exerts a neuroprotective effect in rats with acute carbon monoxide poisoning by activating autophagy through the mTOR signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 14, p. 4610, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-55198-z.

WESCH, N. et al. Atg8-Family Proteins-Structural Features and Molecular Interactions in Autophagy and Beyond. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2008, 2020. DOI: 10.3390/cells9092008.

WHITTAKER, P. A. The petite mutation in yeast. In: **Subcellular Biochemistry**. [S. l.]: Springer, 1979. v. 6, p. 175-232. DOI: 10.1007/978-1-4615-7945-8_4.

WOLLMER, M. A. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 8, p. 762-773, ago. 2010. DOI: 10.1016/j.bbalip.2010.05.009.

WRZACZEK, M.; BROSCHE, M.; KANGASJÄRVI, J. ROS signaling loops - production, perception, regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 5, p. 575-582, out. 2013. DOI: 10.1016/j.pbi.2013.07.002.

YANG, Z. et al. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 814-822, 2010. DOI: 10.1038/ncb0910-814.

YIN, Z. et al. The Roles of Ubiquitin in Mediating Autophagy. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2025, 2020. DOI: 10.3390/cells9092025.

YOU, T. et al. Analysing GCN4 translational control in yeast by stochastic chemical kinetics modelling and simulation. **BMC Systems Biology**, v. 5, p. 131, 2011. DOI: 10.1186/1752-0509-5-131.

YU, L.; CHEN, Y.; TOOZE, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 207-215, 2018. DOI: 10.1080/15548627.2017.1378838.

YUAN, W. et al. General Control Nonderepressible 2 (GCN2) Kinase Inhibits Target of Rapamycin Complex 1 in Response to Amino Acid Starvation in

Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 7, p. 2660-2669, 17 fev. 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.772194.

YUN, H. R. et al. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3289, 6 maio 2020. DOI: 10.3390/ijms21093289.

ZAFFAGNINI, G. et al. Mechanisms of selective autophagy. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, p. 1714-1724, 2016. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.

ZAIATZ-BITTENCOURT, V. et al. Butyrate limits human natural killer cell effector function. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2715, 15 fev. 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-29731-5.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 4350965, 2016. DOI: 10.1155/2016/4350965.

ZHANG, J. et al. Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells: Implications for Apoptosis. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0147218, 19 jan. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0147218.

ZHANG, L. et al. Butyrate in Energy Metabolism: There Is Still More to Learn. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 159-169, 2021. DOI: 10.1016/j.tem.2020.12.003.

ZHAO, R. Z. et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p. 3-15, jul. 2019. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4188.

ZHOU, H. et al. Microbial Metabolite Sodium Butyrate Attenuates Cartilage Degradation by Restoring Impaired Autophagy and Autophagic Flux in Osteoarthritis Development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 659597, 9 abr. 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.659597.