

**MECANISMOS DE AÇÃO DE IMUNOSSUPRESSORES USANDO
LEVEDURA COMO MODELO: INTEGRAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO E TRANSPORTE DE CÁLCIO E PRÓTONS**

Mayara Cristina de Freitas Correia

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO-UENF**

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro - 2024

MECANISMOS DE AÇÃO DE IMUNOSSUPRESSORES USANDO LEVEDURA COMO MODELO: INTEGRAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO E TRANSPORTE DE CÁLCIO E PRÓTONS

Mayara Cristina de Freitas Correia

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia e Biologia Celular e Molecular em Saúde.

Orientadora: Anna Lvovna Okorokova-Façanha

Coorientador: Antonio Jesus DoriguettoCogo

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro – 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C824

Correia, Mayara Cristina de Freitas.

Mecanismos de ação de imunossupressores usando levedura como modelo : integração das vias de sinalização e transporte de cálcio e prótons. / Mayara Cristina de Freitas Correia. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

65 f. : il.

Bibliografia: 62 - 65.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientadora: Anna Lvovna Okorokova Façanha.

Coorientador: Antônio Jesus Dorighetto Cogo.

1. Calcineurina. 2. H⁺-ATPases. 3. Imunossupressores . 4. TOR. 5. *S.pombe*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Mecanismos de ação de imunossupressores usando levedura como modelo: integração das vias de sinalização e transporte de cálcio e prótons

Mayara Cristina de Freitas Correia

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia e Biologia Celular e Molecular em Saúde.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2024

Comissão examinadora:

Profª Drª. Thatiana Lopes Biá Ventura Simão (LBR/CBB/UENF)

Profª Drª. Erica de Oliveira Mello (LFBM/CBB/UENF)

Dr. Rodrigo da Silva Gebara (Prefeitura Municipal de Carapebus)

Prof Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Coorientador) (LBCT/CBB/UENF)

Profª Drª. Anna Lvovna Okorokova Façanha (Orientadora) (LFBM/CBB/UENF)

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo, por estar ao meu lado em todas as fases desta nova jornada me dando forças para continuar não importando o obstáculo que aparecessem.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Anna Okorokova, pelos conhecimentos compartilhados, pelas revisões e por me ajudar a progredir a cada dia, para eu me tornar uma bióloga melhor. Ao meu coorientador que hoje também é professor Dr. Antônio Cogo por todo conhecimento e paciência durante todos esses anos desde iniciação científica até aqui, sempre auxiliando nos ensaios.

A FAPERJ pelo apoio financeiro que possibilitou que eu cumprisse mais esta etapa. A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por toda a infraestrutura e funcionários que tornaram esta pesquisa possível.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de fazer parte deste momento e contribuir com sugestões e novos conhecimentos

As minhas irmãs científicas “HITS” Daphne, Manuela e Sílvia pelas contribuições tanto dentro do laboratório com ajudas nos experimentos, quanto fora dando apoio moral e conselhos. Em especial a Daphne que foi uma amizade inesperada, porém necessária para levar com mais leveza esse mestrado, por me motivar e sempre estar junto comigo nos experimentos e também fora do laboratório.

Aos professores, técnicos, alunos e funcionários do LFBM, pelo apoio e convívio.

A minha família pais e irmãos, Renata, Marcos, Markos e Barbara pelo amor e incentivo dado ao longo desses anos, sempre me dando forças para continuar mesmo com a distância nunca me deixaram sozinha.

Em especial a minha mãe Renata que sempre foi minha inspiração como pessoa, mulher e mãe sempre me ajudando, aconselhando e acolhendo quando era preciso.

Por último e não menos importante meu filho, Arthur que desde que nasceu é a minha maior inspiração para me tornar uma pessoa melhor e buscar sempre o melhor, sendo minha força motriz nesse período.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	vi
Lista de Figuras	vii
RESUMO.....	viii
Abstract.....	ix
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : Organismo modelo	11
1.2 Sinalização por cálcio e calcineurina	12
1.3 Complexo alvo da rapamicina (TORC).....	16
1.4 Rapamicina	19
1.5 Fingolimode.....	21
1.6 Sistemas primários de transporte de prótons	23
1.7 V-H ⁺ -ATPase.....	25
1.8 Sistemas endomembranas e vacúolos/lisossomos	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Microrganismos utilizados.....	32
3.2 Cultivo das cepas em meio sólido.....	32
3.3 Cultivo e curva de crescimento em meio líquido.....	32
3.4 Marcação de vacúolos.....	33
3.5 Isolamento das membranas celulares	33
3.6 Transporte de H ⁺ ATP-dependente em vesículas de membranas celulares	34
3.7 Atividade ATPásica de V-H ⁺ -ATPase em vesículas de membranas celulares ..	37
3.8 Ensaio de acidificação extracelular induzida pela glucose	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Efeito de rapamicia e fingolimode no crescimento celular de <i>S. pombe</i>	39
4.2 Efeito de rapamicina e fingolimode na morfologia celular de <i>S. pombe</i>	41
4.3 Efeitosde rapamicina e fingolimode na dinâmica vacuolar	43
4.4 Efeito de rapamicina e fingolimode na atividade da V-H ⁺ -ATPase.....	45
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

Lista de Abreviações

ACMA, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina

ATP, adenosina trifosfato

ATPase, adenosina trifosfatase

Ca²⁺, íon de cálcio

CaM, calmodulina

CaN, calcineurina

ConcA, Concanamicina A

Crz1, fator de transcrição represora de calcineurina-1

DMSO, dimetilsulfóxido

eIF4E, fator eucariótico de iniciação de tradução

FM4-64, 3-trietilamonio-propil)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridínio-dibrometo

FTY720, cloridrato de fingolimode

NFAT, fator nuclear de ativação de células T

p53, proteína supressora de tumor

Ppb1, subunidade catalítica de calcineurina em levedura de fissão

RNAi, RNA de interferência

S1P, esfingosina-1-fosfato

S6, -proteína kinase

Ser, aminoácido serina

SphK, esfingosinaquinase

Thr, aminoácido treonina

TORC, complexo TOR (1 e 2)

TOR, proteína quinase alvo de rapamicina

YES, meio de cultura

Lista de Figuras

Figura 1: Via de sinalização de calcineurina por cálcio/calmodulina nas células e desfosforilação de proteínas alvo. NFAT (fator nuclear de células T ativadas), Crz1 (fator de transcrição responsivo a calcineurina 1).	14
Figura 2: Complexos TOR e seus componentes.....	17
Figura 3: Vias de regulação dos complexos Tor1 e Tor2.....	19
Figura 4: Estrutura química do fármaco rapamicina.....	20
Figura 5: Estrutura química do fármaco fingolimode.....	21
Figura 6: Esquema representativo das bombas protônicas do tipo V-H ⁺ -ATPase, H ⁺ -ATPase de membrana plasmática e F1F0-ATP-sintase.....	25
Figura 7: Representação esquemática da determinação da velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H ⁺ em vesículas de membranas celulares.....	36
Figura 8: Efeito da rapamicina e fingolimode no cultivo de <i>S. pombe</i>	40
Figura 9: Efeito da rapamicina e fingolimode na morfologia das células de <i>S. pombe</i>	42
Figura 10: Marcação do vacúolo em células <i>S. pombe</i> com sonda fluorescente FM4-64.	44
Figura 11: Análise estatística da quantificação de vacúolos em <i>S. pombe</i>	44
Figura 12: Cinética de decaimento da fluorescência da sonda ACMA durante o transporte de H ⁺ ATP-dependente em vesículas de membranas isoladas de células <i>S. pombe</i> cultivadas com rapamicina e fingolimode.....	45
Figura 13: Atividade de V-H ⁺ -ATPase em membranas de <i>S. pombe</i>	46
Figura 14: Atividade hidrolítica de V-H ⁺ -ATPase de <i>S. pombe</i>	47
Figura 15: Ensaio de acidificação extracelular em resposta a glicose extracelular.	49

RESUMO

A calcineurina é uma proteína fosfatase ativada por Ca^{2+} /calmodulina que se tornou o foco de pesquisas devido ao seu papel regulador e sinalizador em diversos processos celulares. A calcineurina é alvo de alguns fármacos imunossupressores que inibem a proliferação e diferenciação de células T, transcrição de IL-2 e citocinas. O descontrole na sinalização calcineurina-dependente está associado com fenômenos hiperproliferativos, doenças autoimunes e câncer. Dentre imunossupressores empregados clinicamente estão rapamicina e fingolimode, que inibem mTOR e receptor de esfingosina-1-fosfato, respectivamente. A calcineurina é conservada em células eucarióticas, e em leveduras e demais fungos, tem papel essencial no controle do ciclo celular, resposta aos estresses ambientais, morfogênese, virulência e homeostase iônica incluindo a de cálcio. Em células fúngicas, o vacúolo é essencial para homeostase e sinalização de Ca^{2+} e para controle de pH celular, devido a presença de V-H^+ -ATPase e transportadores de Ca^{2+} na membrana vacuolar. O presente estudo teve como objetivo aprofundar a caracterização dos mecanismos de ação de imunossupressores usando levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* como modelo, com ênfase em mecanismos responsáveis pelo controle da proliferação celular relacionados com a sinalização por fluxos iônicos. Especificamente, foi avaliado o efeito de rapamicina e fingolimode no crescimento celular, acidificação extracelular, organização da rede endomembranar/vacuolar, atividade das V-H^+ -ATPase em células do tipo selvagens e mutante deficiente do gene que codifica para a subunidade catalítica de calcineurina. Os resultados mostraram que ambos os fármacos são capazes de inibir a proliferação celular e interferem com fissão/fusão vacuolar, atividade de V-H^+ -ATPase e efluxo de H^+ induzido por glicose, sendo que os efeitos negativos foram exacerbados na ausência de calcineurina. Dados sugerem provável modulação da H^+ -ATPase de membrana plasmática e vacuolar/Golgi e correlação entre as vias TOR e calcineurina dependentes. Esperamos que a caracterização das mudanças no padrão de crescimento e morfologia celular associados com efeitos dos imunossupressores sobre sistemas de transporte e sinalização de H^+ e Ca^{2+} possibilita maior compreensão de mecanismos moleculares que integram os sistemas de controle do pH e de assinaturas iônicas e redox de fenômenos fisiopatológicos proliferativos.

Palavras-chave: calcineurina, fingolimode, H^+ -ATPase, rapamicina.

Abstract

Calcineurin is a Ca^{2+} /calmodulin-activated protein phosphatase that has become the focus of research due to its regulatory and signaling role in various cellular processes. Calcineurin is a target of immunosuppressive drugs that inhibit the proliferation and differentiation of T cells, IL-2 transcription, and cytokines. Dysregulation in calcineurin-dependent signaling is associated with hyperproliferative phenomena, autoimmune diseases, and cancer. Among the clinically employed immunosuppressants are rapamycin and fingolimod, which inhibit mTOR and sphingosine-1-phosphate receptor, respectively. Calcineurin is conserved in eukaryotic cells, and in yeasts and other fungi it plays an essential role in cell cycle control, response to environmental stresses, morphogenesis, virulence, and ion homeostasis. In fungal cells, the vacuole is essential for Ca^{2+} homeostasis and signaling and for regulation of cellular pH, due to the presence of V- H^{+} -ATPase and Ca^{2+} transporters in the vacuolar membrane. The present study aimed to deepen the characterization of the mechanisms of immunosuppressants using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model, with an emphasis on mechanisms responsible for cell proliferation control related to ion flux signaling. Specifically, the effect of rapamycin and fingolimod on cell growth, extracellular acidification, endomembrane/vacuolar network organization, V- H^{+} -ATPase activity in wild-type and mutant cells deficient in the gene encoding the catalytic subunit of calcineurin was evaluated. The results showed that both drugs can inhibit cell proliferation and interfere with vacuolar fission/fusion, V- H^{+} -ATPase activity, and glucose-induced H^{+} efflux, with negative effects being exacerbated in the absence of calcineurin. Data suggest a likely modulation of plasma membrane and vacuolar/Golgi H^{+} -ATPase and correlation between TOR and calcineurin-dependent pathways. We expect that characterizing changes in growth pattern and cellular morphology associated with the effects of immunosuppressants on H^{+} and Ca^{2+} transport and signaling systems will enable a better understanding of molecular mechanisms integrating pH control systems and ion and redox signatures of proliferative pathophysiological phenomena.

Keywords: calcineurin, fingolimod, H^{+} -ATPase, rapamycin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Schizosaccharomyces pombe*: Organismo modelo

A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* é um fungo ascomiceto unicelular, levedura de fissão, que vem sendo usada como modelo de pesquisas biomédicas para estudo de diversos processos celulares eucarióticos como regulação do ciclo celular. Em 2001 foi modelo de estudo do ganhador do Prêmio Nobel para Sir Paula Nurse (Hoffman et al., 2015). A característica essencial que torna *S. pombe* um modelo único e potente para estudo do ciclo celular é seu crescimento polarizado e divisão simétrica. É uma levedura distante evolutivamente da outra levedura modelo, a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*, que divergiram por volta de 350-400 milhões anos atrás, e apresenta algumas características mais em comuns com humanos, diferente de *S. cerevisiae*, como dinâmica da cromatina, organização gênica, presença de íntrons e splicing de pré-mRNA, mecanismos epigenéticos de silenciamento gênico e vias de RNAi (Hoffman et al., 2015).

Além disso, as cepas laboratoriais de *S. pombe* apresentam uma maior uniformidade genética, quando comparadas as cepas da levedura de brotamento *S. cerevisiae*, devido ao fato de todas as cepas de *S. pombe* serem obtidas do mesmo isolado original, garantindo resultados mais uniformes (Sunnerhagen, 2002).

Durante as últimas décadas, a pesquisa sobre *S. pombe* expandiu-se em todo o mundo e isso levou ao primeiro encontro internacional sobre leveduras de fissão, realizado em Edimburgo em 1999.

São excelentes organismos para identificar alvos moleculares e elucidar mecanismos moleculares/celulares de sensibilidade a diversos fármacos, pois as principais vias de

sinalização e processos envolvidos nas respostas celulares a agentes citotóxicos estão conservadas entre leveduras e células de mamíferos (Vyas et al.,2021).

O sequenciamento do genoma de *S. pombe* foi concluído em 2002 revelando a existência de 5.064 genes codificantes para proteínas, com 3.400 genes não-essenciais (Wood et al., 2002), e a presença de mais de 300 genes conservados entre *S. pombe* e eucariontes mais complexos que foram perdidos em *S. cerevisiae* ao longo da evolução (Wood et al., 2006). Dos 3.597 genes de *S. pombe* que têm genes ortólogos em humanos, aproximadamente 40% (1.471 genes) estão relacionados com alguma doença em humanos (Harris et al., 2021).

1.2 Sinalização por cálcio e calcineurina

Os íons de cálcio (Ca^{2+}) são sinalizadores de uma miríade de processos celulares, e têm múltiplas funções, desde a regulação do ciclo celular, crescimento celular, apoptose, respostas aos estresses ambientais, expressão gênica, liberação de hormônios e neurotransmissores, dentre tantas outras. A alteração na concentração de Ca^{2+} é capaz de afetar diversos processos celulares, além disso, o Ca^{2+} ativa várias proteínas e enzimas reguladoras, tais como calmodulina (CaM), proteínas quinase e fosfatase cálcio-dependentes (Masaki; Shimada, 2022).

A sinalização por Ca^{2+} tem início com a abertura de canais localizados na membrana plasmática (Berridge et al.,2003) e nas membranas de algumas organelas como retículo endoplasmático. Este processo é iniciado por um estímulo que induz ao aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico de 10 a 100 vezes acima do nível basal, seguindo pelo fechamento dos canais e pela rápida remoção de Ca^{2+} do citosol pelos trocadores e bombas de Ca^{2+} (Cunningham e Fink,1994).

A maior parte do Ca^{2+} que entra no citoplasma durante a sinalização é

rapidamente ligada a proteínas ligadoras de Ca^{2+} , como por exemplo a calmodulina ou calreticulina. Porém a presença de organelas intracelulares capazes de acumular este íon é que contribui de forma mais efetiva para a regulação do sinal de Ca^{2+} . Em geral, essa saída do citoplasma é mediada por Ca^{2+} -ATPases ou por trocadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ que usam a gradiente de prótons gerado nas membranas por H^+ -ATPases (Okorokov *et al.*, 2001).

A calcineurina (CaN) é uma proteína serina/treonina fosfatase eucariótica dependente de Ca^{2+} e calmodulina (CaM). É um heterodímero que consiste em uma subunidade catalítica de calcineurina A, contendo um metalocentro binuclear de sítio ativo, e uma subunidade regulatória calcineurina B (Ye *et al.*, 2013). A estrutura da sequência primária das duas subunidades e do heterodímero quaternário é altamente conservada desde a levedura até os mamíferos. Como uma proteína fosfatase do tipo Ser/Thr, a CaN está envolvida em uma variedade de processos celulares dependentes de Ca^{2+} e vias de transdução de sinal. Os fármacos imunossupressores tacrolimus, ciclosporina A inibem a interação das subunidades de CaN na presença de suas respectivas imunofilinas citoplasmáticas, ciclofilinas e proteínas de ligação ao FK506 (Creamer, 2020, Ulengin-Talkish *et al.*, 2023).

A CaN é ativada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio, a CaM e subunidade regulatória da CaN ligam-se ao Ca^{2+} e a CaM liga-se à CaN. O complexo CaM:CaN forma uma fosfatase ativa. Esse processo acopla diretamente a sinalização de Ca^{2+} à desfosforilação, como ocorre por meio de quinases reguladas por CaM para a fosforilação (Figura 1).

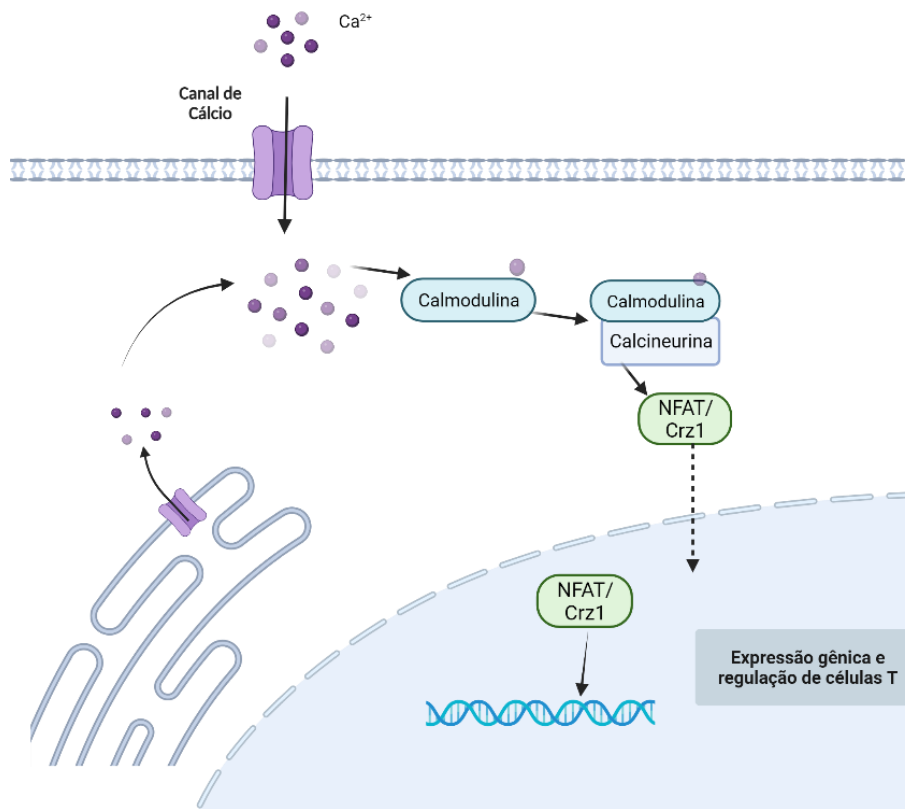


Figura 1: Via de sinalização de calcineurina por cálcio/calmodulina nas células e desfosforilação de proteínas alvo. NFAT (fator nuclear de células T ativadas), Crz1 (fator de transcrição responsivo a calcineurina 1). Esquema elaborado pela autora usando software Biorender (<https://www.biorender.com>).

Uma diferença notável, no entanto, é que existem múltiplas quinases reguladas por CaM, mas CaN é a única fosfatase conhecida por ser diretamente ativada pelo Ca^{2+} (Sun et al., 2019).

CaN exerce seu papel através da defosforilação de substratos proteicos, culminando em mudanças da localização e atividade de proteínas, e expressão gênica, tendo fatores de transcrição Crz1 e NFAT em levedura e humanos, respectivamente, como os principais mediadores da cascata CaN-dependentes (Ulengin-Talkish et al., 2023).

Na levedura de fissão *S. pombe*, a deleção do gene *ppb1⁺* que codifica a subunidade catalítica de CaN, resulta em defeitos no final da citocinese, polaridade celular, resultando em células multisseptadas (Yoshida *et al.*, 1994). Outro estudo demonstrou que mutantes de CaN são hipersensíveis ao Ca^{2+} e sugerindo seu

envolvimento na homeostase de Ca^{2+} (Hirayama et al., 2003). Em estudos anteriores foi mostrado que células de *S. pombe* mutantes para a proteína Cta4- ATPase, foram sensíveis a inibição de CaN, pela droga ciclosporina A, indicando que a atividade de CaN é essencial para a sobrevivência em condições de elevada concentração de Ca^{2+} citoplasmático e nuclear e sob estresse do retículo endoplasmático (Okorokova Façanha et al., 2002).

A compreensão da interação das vias de sinalização como CaN-dependente com demais vias é alvo de diversas pesquisas (Ulengin-Talkish et al., 2023). Em células humanas, foi demonstrado que a ativação do complexo funcional mTORC1 requer uma liberação de Ca^{2+} lisossômico através do canal de Ca^{2+} TRPML1, induzindo a ligação da CaM ao mTOR. Na última década foi observado que o bloqueio da interação entre mTOR e CaM por antagonistas e CaM inibe significativamente a atividade de mTORC1 (Li et al., 2016). Além disso, CaM estimulou a atividade do mTORC1 quinase de maneira dependente de cálcio *in vitro*. Esses resultados sugerem que mTOR é uma quinase dependente de CaM e que o canal TRPML1, Ca^{2+} lisossômico e a CaM desempenham papéis regulatórios importantes na via de sinalização de mTORC1 (Li et al., 2016).

A CaN também desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico. Ela está envolvida na ativação e proliferação de linfócitos T (Ulengin-Talkish et al., 2023). Em algumas condições fisiopatológicas, como em doença autoimune incluindo esclerose múltipla recorrente, o sistema imunológico reconhece como antígeno a proteína básica da mielina culminando na degeneração do sistema nervoso central. Um dos fármacos usados para a esclerose múltipla recorrente é o Fingolimode (GILENYA®) que está relacionado com o tráfego de células T, possuindo assim ações contrárias a CaN desempenha um papel importante na regulação do

sistema imunológico, estando envolvida na ativação e proliferação de células linfócitos T (Ulengin-Talkish et al., 2023). Em algumas condições fisiopatológicas, como na doença autoimune, incluindo esclerose múltipla recorrente, o sistema imunológico ataca erroneamente o sistema nervoso central. Um dos fármacos usados para tratar a esclerose múltipla recorrente é o Fingolimode (GILENYA®), que está relacionado ao tráfego de células T, possuindo assim ações antagonistas (Chiba, 2005).

1.3 Complexo alvo da rapamicina(TORC)

A proteína alvo do imunossupressor rapamicina (TOR) é uma serina/treonina quinase que exerce papel central na sinalização regulando proliferação e processos anabólicos e catabólicos em células eucarióticas em resposta a vários estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo sinalização de fatores de crescimento e nutrientes, hormônios e estresse (Alao et al. 2021).

Originalmente descoberto em leveduras mutantes, a proteína TOR é altamente conservada em todas as células eucarióticas (Weisman R, Choder M., 2000). A levedura de fissão *S. pombe* tem sido amplamente utilizada como modelo para estudar mecanismos moleculares eucarióticos, incluindo a via de sinalização dependente de TOR (Anjum et al., 2023).

Na maioria dos eucariotos, a proteína TOR forma o componente central de um complexo multiprotéico chamado TORC, localizado na membrana de lisossomo/vacúolo. Em *S. pombe*, existem dois homólogos, Tor1 e Tor2, o que gera a formação de dois complexos, TORC1 e TORC2. A subunidade catalítica do complexo é formada pela TOR quinase, Tor1 ou Tor2 (Figura 2). Ambos os complexos são compostos por várias outras proteínas e são distintos em estrutura e função (Aspuria et al, 2007).

Existem diferenças sutis entre a estrutura do complexo TORC em *S. pombe* e o

TORC encontrado em células de mamíferos. Embora ambos os complexos ainda estejam presentes, as células de mamíferos contêm apenas um gene codificante para mTOR capaz de formar dois complexos, o mTORC1 e o mTORC2. Estes complexos também contêm proteínas ortólogas e proteínas diferentes das encontradas na levedura de fissão. As proteínas Raptor definem TORC1 de mamífero (mTORC1), enquanto Rictor está presente apenas em mTORC2. Em *S. pombe* que é o foco deste estudo, a proteína Mip1 define TORC1 e Ste20 define TORC2 (Halovar et al., 2021).

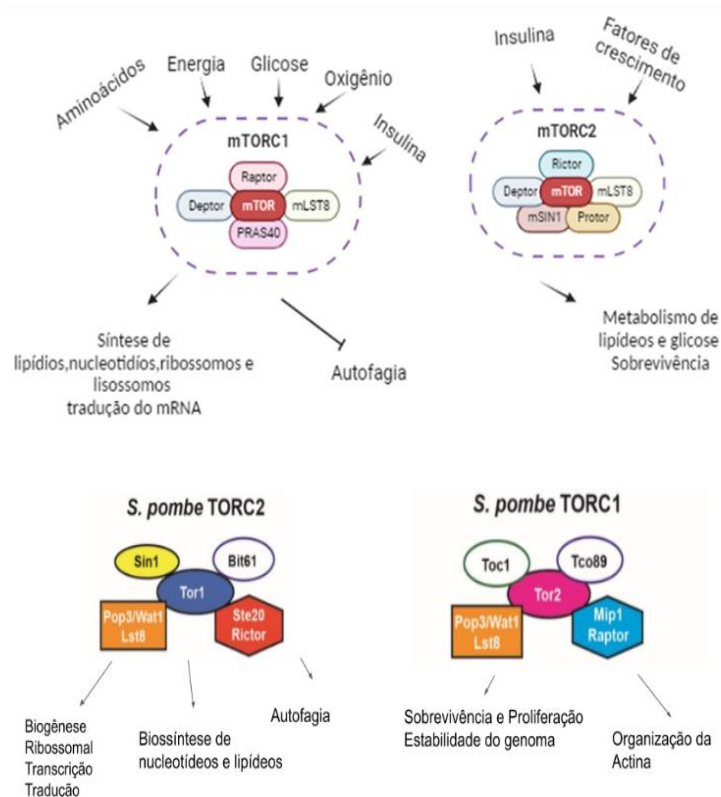


Figura 2: Complexos TOR e seus componentes. Esquema elaborado pela autora usando Biorender (<https://www.biorender.com>).

TORC1 é regulado a montante por muitos estímulos intra e extracelulares, incluindo o regulador do ciclo celular p53 após dano ao DNA, induzido por agentes químicas sem células de mamíferos. mTORC1 também ativa p53 sob condições de proliferação de crescimento, regula a biogênese do ribossomo e a síntese de

proteínas principalmente por meio da fosforilação de dois efetores distintos a jusante, S6K ativado por fosforilação e proteína de ligação a eIF4E (4EBP), que são inativados após a fosforilação. Outros processos anabólicos, incluindo a síntese de lipídios e nucleotídeos, também são afetados. Além disso, esse complexo regula vários processos catabólicos, incluindo a autofagia e proteólise para equilibrar o estado metabólico da célula, e é inibido pelo composto macrolídeo rapamicina, que forma um complexo com seu receptor intracelular FKBP12. A inibição de mTOR por rapamicina imita a privação de nitrogênio em levedura de fissão (Alao et al., 2021).

O TORC2 não é inibido pela rapamicina porque a estrutura impede a ligação do complexo rapamicina/FKBP12. Torin-1 é um conhecido inibidor competitivo de ATP de mTOR que bloqueia o sítio catalítico, impedindo a fosforilação a jusante em ambos os complexos. Devido à falta de inibidores específicos do TORC2, esse complexo é menos estudado e ainda precisa ser elucidado em comparação com seus congêneres. O TORC2 na levedura de fissão não é essencial para a proliferação celular, mas é essencial para a diferenciação sexual e entrada na fase estacionária, duas principais respostas de carência nutricional na levedura de fissão. Curiosamente, TORC2 também demonstrou funcionar cooperativamente com TORC1 para regular a fosforilação de S6K em levedura de fissão. Além disso, o complexo TORC2 é responsável pela regulação da dinâmica da actina, integridade dos telômeros e tamanho celular (Alao et al., 2021).

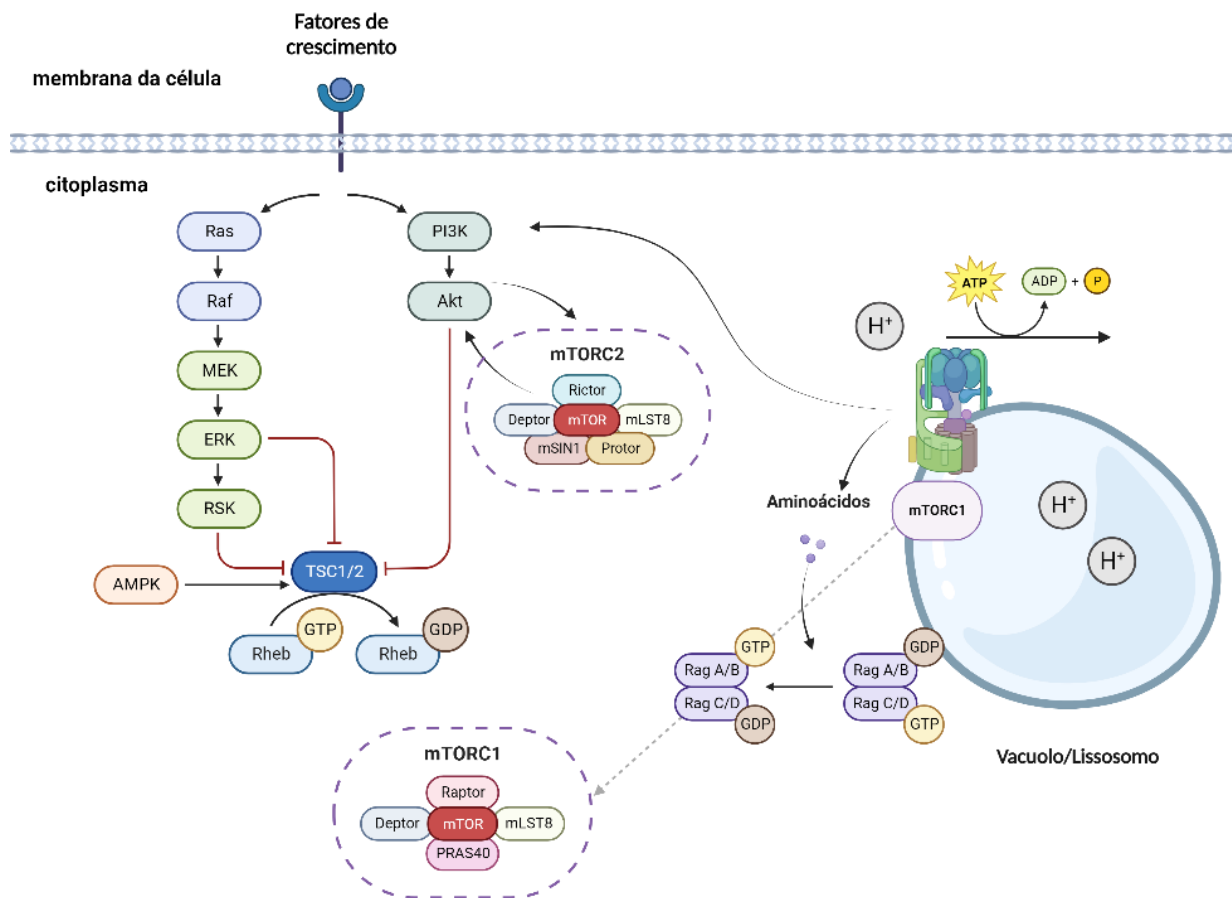


Figura 3: Vias de regulação dos complexos Tor1 e Tor2. Esquema elaborado pela autora usando Biorender (<https://www.biorender.com>).

1.4 Rapamicina

A rapamicina (Figura 4) também conhecida como sirolimus, é uma substância derivada de *Streptomyces hygroscopicus*, inicialmente foi descrita como uma substância com propriedades anti-*Candida albicans* e outros fungos em 1975 (Sehgal; Baker; Vézina, 1975a). No entanto, mais tarde, foi redirecionada para ser utilizada como um fármaco imunossupressora em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, devido à sua notável atividade imunossupressora diminuindo a rejeição ao transplante (Tong et al., 2021a).

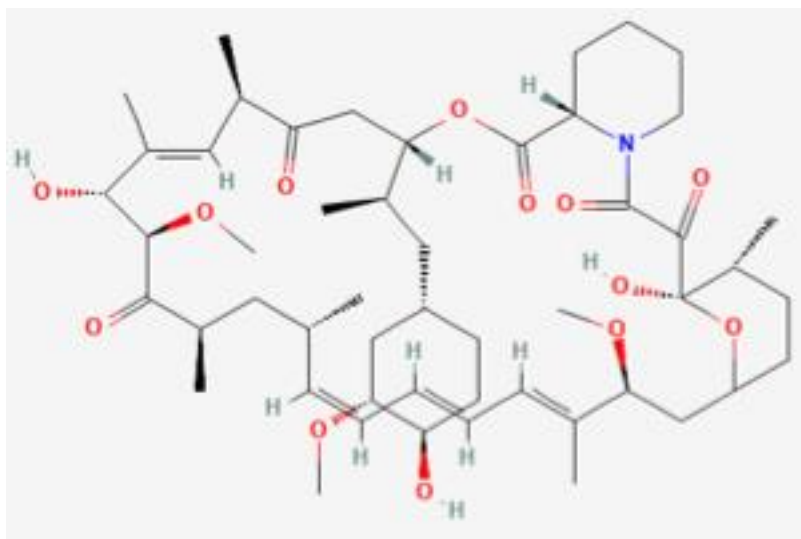


Figura 4: Estrutura química do fármaco Rapamicina. Fonte: Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

A rapamicina tem a capacidade de penetrar na célula e se associar à peptidil-prolil isomerase FKBP12 (proteína citoplasmática de 12kDa membro da família de imunofilinas). Ao fazer isso, a rapamicina inibe a atividade enzimática da FKBP12. É importante destacar que essa inibição não está diretamente relacionada às atividades imunossupressoras ou antifúngicas do fármaco. Os alvos específicos do complexo FKBP12-rapamicina são as quinases TOR (proteínas alvo da rapamicina em células-alvo). Em leveduras como *S. cerevisiae* e *S. pombe*, foram caracterizadas duas proteínas TOR, Tor1 e Tor2. Além disso, foi identificado um único homólogo TOR em organismos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Drosophila melanogaster* e humanos. Essas informações destacam a conservação dos alvos da rapamicina em diferentes espécies, evidenciando sua relevância potencial em processos celulares cruciais (Cruz et al., 2001; Tong et al., 2021a).

Estudos recentes em leveduras modelo, como *S. cerevisiae* e *S. pombe*, revelaram que as quinases Tor desempenham um papel crucial em uma via de detecção de nutrientes. A inibição da sinalização Tor pela rapamicina-FKBP12 induz a autofagia,

suprime a expressão do gene da proteína ribossômica, ativa genes normalmente reprimidos pelo catabolismo de nitrogênio e inibe o processo de tradução (Bastidas et al., 2012).

Em *S. pombe*, a rapamicina demonstrou bloquear a reprodução em resposta à limitação de nutrientes. A quinase Tor2 é essencial em ambos os processos, enquanto em *S. pombe* a quinase Tor1 é necessária para o acasalamento e a entrada na fase estacionária. Essas descobertas sugerem que a via TOR desempenha um papel fundamental como uma rota global de detecção de nutrientes, e essa conservação observada em leveduras pode indicar sua relevância em fungos patogênicos (Rivera; Heitman, 2023).

1.5 Fingolimode

O cloridrato de fingolimode é um pré-farmaco FTY720 (Figura 5) que exerce atividade de imunossupressor modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), descoberto pela modificação química da miriocina, obtida a partir do filtrado da cultura do fungo ascomiceto *Isaria sinclairii* (Hagihara et al, 2014).

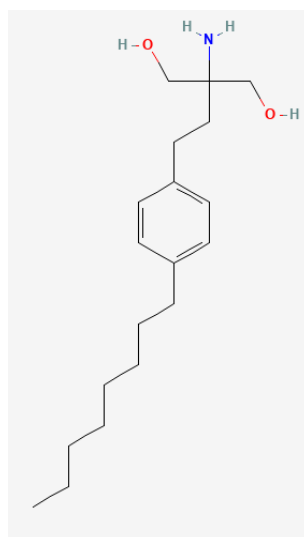


Figura 5: Estrutura química do fármaco fingolimode. Fonte: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

O fingolimode inibe o fluxo de linfócitos dos linfonodos para os vasos linfáticos eferentes e sangue, e os efeitos imunomoduladores do fingolimode são desencadeados principalmente após sua fosforilação pela esfingosina quinase (SphK)2 e subsequente modulação do receptor1 da S1P acoplado à proteína G. Fingolimode, conhecido como Gilenya® empresa farmacêutica da Novartis, foi aprovado em 2017 pela FDA (*Food and Drug Administration*) como um modulador imunológico para tratamento de formas recorrentes da esclerose múltipla (CHIBA, 2005).

Curiosamente, além de seu uso terapêutico como droga imunomoduladora, fingolimode também demonstrou exercer potente atividade antitumoral e antimetastática em diferentes tipos de tumores, incluindo câncer de mama, câncer de bexiga, carcinoma hepatocelular e leucemia (White *et al*, 2016). Várias hipóteses foram propostas para explicar a atividade antitumoral do fingolimode, visto que fingolimode induz a transição de permeabilidade mitocondrial e a subsequente ativação de caspases e regula esses processos por meio de proteínas protetoras mitocondriais da família Bcl-2. Também foi demonstrado que fingolimode regula negativamente as vias de MAP proteína quinase (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase/Akt, regula positivamente quinases ativadas por estresse, como p-38 (Hagihara *et al*, 2014).

Embora os efeitos biológicos do fingolimode sejam geralmente atribuídos ao seu papel como imitador do S1P após a fosforilação, muitas evidências sugerem que o fingolimode pode atuar por meio de outros alvos celulares (Hagihara *et al*, 2013; Takasaki *et al*, 2018).

Estudo mais recente demonstram que efeito não está vinculado somente aos receptores S1P e, em grande parte, é atribuído à habilidade do fingolimode de induzir a endocitose de diversos transportadores de nutrientes. Dessa forma, reduz a

capacidade das células cancerígenas de atenderem às suas exigências anabólicas elevadas (Barthelemy et al., 2017).

Para entender melhor as vias de sinalização reguladas por fingolimode e identificar os alvos intracelulares diferentes de receptores SP-1, foi analisado o efeito de fingolimode nas células de levedura de fissão. Foi demonstrado que o fingolimode ativa a sinalização de calcineurina, estimulando o influxo de Ca^{2+} mediado por canal Yam8/Cch1 da membrana plasmática e que deleção em *ppb1+*, que codifica subunidade catalítica da calcineurina, uma proteína fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, e a deleção *prz1+*, que codifica um fator de transcrição a jusante da calcineurina, confere maior sensibilidade das células a fingolimode, provavelmente pela perturbação da homeostase de Ca^{2+} (Hagihara *et al.*, 2013).

1.6 Sistemas primários de transporte de prótons

O transporte de íons, aminoácidos, açúcares e outras substâncias através da membrana é essencial para a sobrevivência das células. O fluxo dessas moléculas ocorre por meio de proteínas transportadoras de membrana, havendo a necessidade de absorção de nutrientes, manutenção do turgor, expansão celular, desenvolvimento, compartimentalização de íons potencialmente citotóxicos e transdução de sinal.

As ATPases de membrana são enzimas que utilizam a energia da hidrólise do ATP para realizar o transporte de íons através de membranas biológicas (Pedersen e Carafoli, 1987). As ATPases do tipo P são divididas em cinco famílias baseadas na sequência de aminoácidos e na seletividade de substrato/íon que transportam. As P1-ATPases estão envolvidas no transporte de metais pesados como cobre; as P2-ATPases transportam cátions monovalentes como sódio e potássio em células animais, e cátions divalentes como cálcio; as P3-ATPases transportam prótons; as

P4-ATPases transportam aminofosfolipídeos em células de eucariontes, e as P5-ATPases, apesar de participar na homeostase de cálcio e manganês, foram recentemente definidas como translocases (Palmgren e Nissen, 2011; McKenna et al., 2020).

Os sistemas primários de transporte membranar de prótons ou H⁺-ATPases (Figura 3) geram um gradiente eletroquímico de H⁺ que é utilizado para energizar o transporte secundário mediado por proteínas carreadoras (Garrill, 1994; Van Belle e Andre, 2001). As H⁺-ATPases do tipo P, ou P3 ATPases, localizadas na membrana plasmática de células fúngicas e vegetais, são enzimas chaves que geram o gradiente eletroquímico de prótons capaz de energizar a membrana e garantir o transporte secundário de íons e metabólitos através da membrana plasmática, apresentando um papel essencial na regulação do pH intracelular (Goffeau e Slayman, 1981; Lefebvre et al., 2003). A célula eucariótica apresenta também o complexo multiprotéico da H⁺-ATPase do tipo V (V-H⁺-ATPases), localizadas em membrana vacuolar de plantas e fungos, membranas lisossomais das células animais e na membrana plasmática de osteoclastos e das células tumorais. Já as ATPases do tipo F (F1F0-ATPases) são encontradas na membrana interna das mitocôndrias. Enquanto as do tipo F são responsáveis pela síntese de ATP usando o gradiente de H⁺, as do tipo V e P utilizam da energia do hidrólise ATP para gerar o gradiente de H⁺ (Perdersen e Carofoli, 1987).

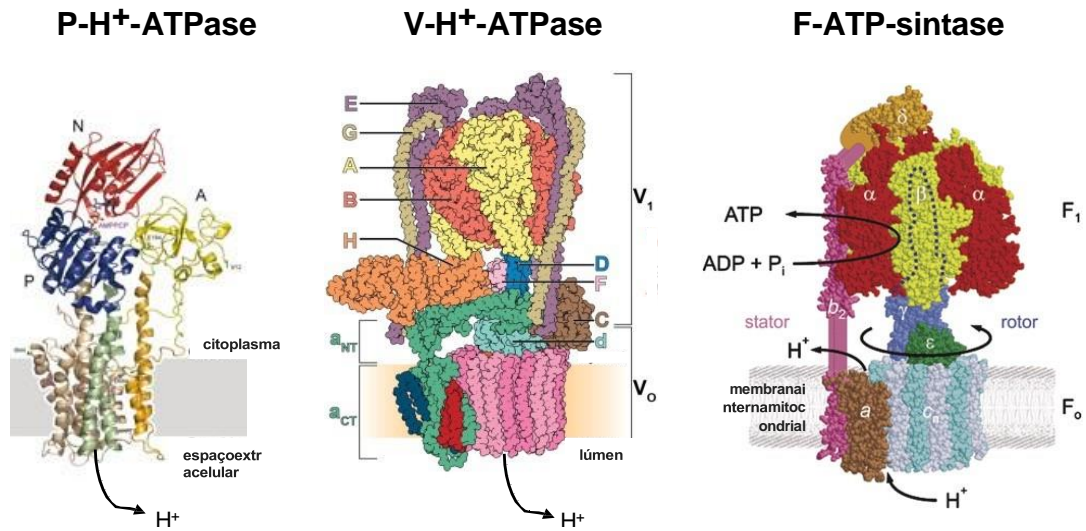


Figura 6: Esquema representativo das bombas protônicas do tipo V-H⁺-ATPase, H⁺-ATPase de membrana plasmática e F₁F₀-ATP-sintase, respectivamente. Modificado de Pedersen et al. (2007), Vasanthakumar et al. (2020) e Gao et al. (2005).

1.7 V-H⁺-ATPase

As H⁺-ATPases do tipo V (V-H⁺ ATPase ou V-H⁺-ATPase) pertencem a uma família de sistemas primários de transporte de prótons dependentes de ATP, que translocam H⁺ através de endomembranas de todas as células eucarióticas, acidificando compartimentos intracelulares (Nishi e Forgac, 2002; Collins; Forgac, 2020). Inicialmente encontradas em vacúolos de fungos e plantas, posteriormente foram localizadas em lisossomos das células animais e membrana plasmática das células cancerígenas e algumas células especializadas. As V-H⁺-ATPases também estão presentes em membranas de Golgi, ER/nuclear. As V-H⁺-ATPases têm um papel importante em vários processos celulares como regulação de pH celular e extracelular, transporte de íons e nutrientes, tráfego de membranas, sorting de proteínas, fusão/fissão de vesículas membranares, proliferação e migração de células

tumorais, virulência fúngica, endocitose e entrada de vírus (Kane, 2016; Stevens E Forgac 1997; Forgac, 1998; Yi Wang et al., 2018, Costa Et Al, 2018).

Sua estrutura em mamíferos é composta das subunidades A, B, C, D, E, F, G e H formam um domínio V1 responsável pela hidrólise do ATP, enquanto as subunidades a, d, e, c e c' constituem um domínio V0 que é inserido na membrana celular e participa da transporte de prótons, ao todo são 14 subunidades. Vale ressaltar que os eucariotos superiores contêm também as subunidades acessórias. Nas células de mamíferos, as subunidades da V-H⁺-ATPase estão presentes em diferentes isoformas codificados por diferentes genes, com seus nomes de genes começando com "ATP6" e depois um domínio "V1" ou "V0", seguido por uma subunidade ou isoformas (Indrawinata; Argiropoulos; Sugita, 2023). Na levedura, os nomes das subunidades são indicados por "VMA" ("atividade ATPase da membrana vacuolar") e apenas uma subunidade possui múltiplas isoformas. A subunidade "a" da levedura codifica as isoformas VPH1 e STV1, que direcionam V-H⁺-ATPase s para vacúolos e aparelho de Golgi, respectivamente. A caracterização dessas subunidades pode nos ajudar a entender a expressão diferencial e localização de V-H⁺-ATPase s em diferentes espécies e células (Chen et al., 2022).

O ambiente ácido onde as enzimas lisossômicas realizam suas atividades é mantido pela atividade de V-H⁺-ATPase ,em particular, a macropinocitose, uma via endocítica não seletiva, permite que as células absorvam quantidades suficientes de proteínas extracelulares para manter a sobrevivência durante a escassez de aminoácidos (Ratto et al., 2022). Em diferentes linhagens de células tumorais, a macropinocitose é frequentemente regulada positivamente, o que facilita o crescimento de células malignas em microambientes tumorais com baixa vascularização e deficiência nutricional. Além disso, o lisossomo desempenha um

papel crucial no catabolismo de proteínas provenientes de fontes intracelulares, fornecidas pela autofagia. Ao reciclar o conteúdo nutricional das proteínas intracelulares, a autofagia possibilita a sobrevivência celular durante períodos transitórios de escassez de nutrientes (Ratto et al., 2022).

As V-H⁺-ATPases da membrana plasmática apresentam funções específicas para cada tipo celular, como por exemplo, na proliferação e migração de células tumorais (Costa et al., 2018). As V-H⁺-ATPases da membrana plasmática são necessárias na invasão de células tumorais, contribuindo com um ambiente extracelular ácido propício para a atividade de catepsinas secretadas, proteases que demonstraram funcionar em metástases por muitas células tumorais e que conseqüentemente a biossíntese da V-H⁺-ATPase é aumentado (Toei; Saum; Forgac, 2010)(Collins; Forgac, 2020).

Em resposta à oscilação nos níveis de nutrientes e aminoácidos, V-H⁺-ATPase mantém a homeostase do pH. É importante ressaltar que a V-H⁺-ATPase regula as vias Ras-PKA e TORC1-Sch9 através das GTPases Arf1 e Gtr1, respectivamente, ou seja, há uma ativação da V-H⁺-ATPase que pode envolver a protonação direta da sua subunidade “a”. As vias de sinalização nutricional, como o alvo do complexo de rapamicina 1 (TORC1) e a proteína quinase A Ras (PKA), desempenham papéis importantes na regulação do crescimento e da fisiologia celular.

1.8 Sistemas endomembranas e vacúolos/lisossomos

Os sistemas de endomembranas compreendem organelas membranares interconectadas formando uma rede que caracteriza as vias endocítica e secretora, desempenhando um papel direto no tráfego de vesículas (Scott; Vacca; Gruenberg,

2014; Maxfield; Mcgraw, 2004). Dentro desse sistema, incluem-se o envoltório nuclear, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vacúolos/lisossomos, vesículas de transporte e membrana plasmática. A interação entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi implica o transporte de proteínas ou vesículas, no qual o retículo endoplasmático é responsável por conduzir até o aparelho de Golgi, que, por sua vez, direciona para o exterior da célula, caracterizando a via secretora (Alberts et al., 2010).

Na via endocítica, as moléculas são conduzidas aos vacúolos/lisossomos por meio de endossomos, tanto iniciais quanto tardios (Gadila; Kim, 2016; Guo; Sirkis; Schekman, 2014). O processo de formação e transporte de vesículas é coordenado por um conjunto de Rab GTPases recrutadoras de revestimento, assegurando a montagem adequada dos revestimentos nos endossomos e direcionando-os para locais específicos na membrana-alvo, onde proteínas SNARE medeiam a fusão das membranas (Alberts et al., 2010; Zerial; McBride, 2001).

O retículo endoplasmático e os lisossomos/vacúolos desempenham papéis cruciais na sobrevivência celular, formando sítios de contato importantes (HARIRI et al., 2018). Em condições de escassez de nutrientes, a célula organiza reservas de lipídios e as disponibiliza na interface física entre o retículo endoplasmático e os vacúolos. Diversas proteínas e metabólitos presentes nos vacúolos são sintetizados no retículo endoplasmático e transportados para os vacúolos por meio do tráfego de vesículas mediadas por COPII, do retículo endoplasmático para o Golgi (Xiang; Etxeberria; Van Den End, 2013).

Existe também uma rota de tráfego membranar direto entre o retículo endoplasmático e o vacúolo que não envolve o aparelho de Golgi, mas sim a maquinaria de autofagia, uma parte integrante da via de resposta a proteínas mal-enoveladas (via UPR) desencadeada em resposta ao estresse do retículo

endoplasmático. Existe também uma rota de tráfego membranar direto entre o retículo endoplasmático e o vacúolo, que não envolve o aparelho de Golgi. Essa rota é mediada pela maquinaria de autofagia, uma parte integrante da via de resposta a proteínas mal enoveladas (via UPR), desencadeada em resposta ao estresse do retículo endoplasmático (Michaeli; Avin-Wittenberg; Galili, 2014; Viotti et al., 2013). Além disso, os íons de Ca^{2+} são armazenados em endomembranas, que desempenham um papel ativo na sinalização e na troca de Ca^{2+} com o retículo endoplasmático, através de Ca^{2+} ATPases e canais de Ca^{2+} (Yang et al., 2016; Liu et al., 2012).

Os vacúolos fúngicos são organelas altamente dinâmicas que podem ter modificações em tamanho e morfologia em resposta a alterações ambientais (Banta et al., 1988). Igualmente aos lisossomos, são importantes em diversos processos, incluindo a regulação da homeostase celular, degradação de componentes celulares, armazenamento de íons, metabólitos e nutrientes, polifosfatos, poliaminas, controle de pH celular e sinalização de cálcio (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). O tamanho dos vacúolos pode ser alterado de acordo com que a célula cresce em tamanho. Em leveduras de brotamento, os vacúolos têm padrão específico de herança para as células-filhas (Chan et al., 2016; Weisman; Bacallao; Wickner, 1987). Os vacúolos da levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* são mais numerosos que em *S. cerevisiae* (Chadwick et al., 2020; Mulvihill et al., 2001).

A maioria dos vacúolos normalmente se encontram ao redor do núcleo, seguido por uma minoria que se encontra nas extremidades da célula, essa distribuição é simétrica e espelhada, em relação ao núcleo (Chadwick et al., 2020). A posição dos vacúolos pode ser afetada por mutações ou alterações na actina ou citoesqueleto, uma vez que estão conectados à rede de microtúbulos (Mulvihill et al., 2001). Ao

ocorrer ruptura nos microtúbulos, a localização de vacúolos ao redor do núcleo é parcialmente perdida, sugerindo que há uma participação ativa dos microtúbulos na localização vacuolar (Chadwick et al., 2020).

A fusão e fissão dos vacúolos é um processo dependente de diversos fatores e proteínas, como a participação ativa da V-H⁺-ATPase, em que a unidade V0 atua na fusão das membranas vacuolares (Peters et al., 2001), e das vias Sty1, Pmk1 e Ypt7 responsáveis pela resposta ao estresse hipotônico (Bone et al., 1998). A ausência da proteína Vps1, relacionada à dinamina, pode resultar em vacúolos menores e com capacidade de fusão e fissão reduzida (Röthlisberger et al., 2009). O pH do lúmen vacuolar é normalmente ácido em relação ao citoplasma, cujo pH está próximo à neutralidade, em torno de 6.0, devido ao transporte ativo de prótons do citoplasma para o vacúolo pela V-H⁺-ATPase e do citoplasma para espaço extracelular pela H⁺-ATPase de membrana plasmática (MARTÍnez-Muñoz; Kane, 2008; Preston; Murphy; Jones, 1989).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aprofundar o conhecimento sobre mecanismo de ação dos fármacos imunossupressores rapamicina e fingolimode relacionado com o controle da proliferação celular, com ênfase na modulação da V-H⁺-ATPase e transporte de H⁺ pelas vias de sinalização dependentes de calcineurina, utilizando a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* como modelo.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito de rapamicina e fingolimode no crescimento e morfologia celular de levedura e comparar a sensibilidade entre a cepa tipo selvagem e mutante deficiente de calcineurina;
- Determinar o efeito de rapamicina e fingolimode na organização vacuolar/endossomal;
- Isolar as membranas de células cultivadas na presença de rapamicina e fingolimode;
- Determinar o efeito de rapamicina e fingolimode na acidificação extracelular induzido pela glicose;
- Determinar o efeito de rapamicina e fingolimode na atividade de V-H⁺-ATPase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados

As cepas de levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas neste trabalho foram Fy1180 (tipo selvagem ou *wild-type*) genótipo h⁺otr1R(SphI)::ade6⁺ura4-D18 leu1-32 ade6-M210, e mutante *ppb1Δ* deficiente da subunidade catalítica de calcineurina Ppb1p (leu1-32 ura4-D18 ppb1::ura4).

3.2 Cultivo das cepas em meio sólido

As células de levedura *S. pombe* foram cultivadas em meio YES (3% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 75 mg/L de adenina, arginina, uracila e 250 mg/L leucina) a 30°C. O meio de cultura geralmente apresenta pH 5-8-pH 6,2. Para se obter o meio sólido, foi acrescido 2,5% de ágar à concentração final. O meio de cultura foi esterilizado na autoclave a uma pressão de 1atm 121 °C, por 15 min. O meio sólido foi vertido em placas de Petri (esterilizadas) na câmara de fluxo laminar vertical (Biovera) e posteriormente mantidas em estufa (TecnaTe- 371 BOD) a 30°C por 24 h, a fim de obtermos um controle de esterilidade. Para a manutenção das cepas, após este procedimento acima citado, uma alçada da colônia das células de levedura foi retirada do meio com ágar de uma placa de Petri e semeada em outra placa fazendo estrias contínuas, de três em três meses. A placa foi incubada a 30°C por 3 dias até aparecimento de colônias, e mantida na a 4°C. Para as análises da morfologia e polaridade celular, as células foram observadas em microscópio óptico Zeiss.

3.3 Cultivo e curva de crescimento em meio líquido

Uma pré-cultura foi preparada em meio líquido a partir da placa de cultivo, sem ajuste de pH. Uma alíquota desta pré-cultura foi adicionada em frascos Erlenmeyers

de modo que a densidade ótica inicial da cultura correspondesse a $A_{600} = 0,01$. A proporção do volume de meio de cultura nos frascos foi de 1:5, a fim de garantir máxima aeração. O crescimento da cultura foi realizado a 30°C na incubadora orbital (Innova 4300, New Brunswick) com rotação de 250 rpm, até a saturação da cultura após 42h de cultivo. O crescimento foi acompanhado através de leituras no espectrofotômetro (Spectrophotometer Bel UV-M51) a 600 nm, mantendo sendo que as medições de densidade ótica de suspensão celular não devem ultrapassar a leitura de $DO_{600} = 0,2$. Para leituras acima desse valor foram realizadas diluições da amostra de suspensão celular no meio de cultivo ou em água. Ensaios foram realizados na presença de 50 nM de rapamicina e 3 μ M de Fingolimode.

3.4 Marcação de vacúolos

As células de levedura foram cultivadas em meio YES, pH 5,8, na ausência (controle) e na presença de 50 nM rapamicina e 3 μ M fingolimode por 18h, coletadas através de centrifugação, lavadas e incubadas com 5 μ M (a partir da solução-estoque de 10 mM em DMSO) da sonda fluorescente FM4-64 (Molecular Probes) por 2 horas a 30° C. As células e vacúolos foram visualizadas no microscópio Zeiss Axion Imager A.2 acoplado à câmera digital AxioCam 2.0, utilizando a objetiva de 63x e filtro set 15 (excitação 546/12, emissão LP 590, beam splitter FT 580). As imagens foram processadas no software AxionVision. Foram observadas pelo menos 50 células por amostra para a determinação do número de vacúolos.

3.5 Isolamento das membranas celulares

Células de *S. pombe* da pre-cultura foram inoculadas em frascos contendo 400 ml de meio rico YES para cada tratamento, de forma que a leitura do pré-inóculo inicial

foi 0,0625 unidade de DO₆₀₀/ml. O volume do inoculo foi calculado considerando o DO₆₀₀ da pre-cultura e tempo de duplicação das células. Após o cultivo celular a 30 °C por 18 h, sob agitação constante de 250 rpm. o isolamento de membranas totais celulares foi iniciado por meio da transformação das células em esferoplastos usando hidrólise enzimática da parede celular com enzima lyticase de *Arthrobacter luteus* (Sigma). As membranas celulares totais foram obtidas através de centrifugação a 88.000×g conforme descrito em Lustoza et al. (2011) usando ultracentrifuga Himac . As membranas obtidas foram aliqüotadas em tubos criogênicos e armazenadas a -70 °C, para uso posterior. A dosagem de proteínas em membranas isoladas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976).

3.6 Transporte de H⁺ ATP-dependente em vesículas de membranas celulares

A determinação do gradiente de H⁺ foi realizada de acordo com método descrito por Okorokov e Lichko (1983) e Cogo *et al* (2018) usando sonda fluorescente ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine), capaz de ligar-se aos H⁺ e atravessar as membranas biológicas. A detecção foi realizada em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm, excitação em 415 nm e emissão em 485 nm. A formação do ΔpH pelas P- e V-H⁺-ATPases foi observada em solução contendo 100 μL de 50 mM MgSO₄.7H₂O (2,5 mM de concentração final); 50 μL de 2 M KCl (50 mM de concentração final); 10 a 100 μL de vesículas de membranas celulares (volume dependente da atividade, de modo que a amplitude máxima (F_{max}) não ultrapasse 50% do decaimento da fluorescência da sonda ACMA); tampão MOPS-KOH (12,5% sacarose, 200 mM MOPS-KOH, pH 7,2) em quantidade necessária para completar 2 mL de volume final do meio de ensaio. Acrescentou-se

3 μL de 1 mM ACMA e após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) iniciou a reação de transporte de H^+ pela adição de 100 mM ATP-KOH pH7,2 (concentração final de 1mM). A cinética de extinção da fluorescência (*quenching*) foi monitorada até atingir o equilíbrio entre o efluxo e o influxo de prótons (*steady-state*), quando foi adicionado 2 M NH_4Cl (concentração final de 20 mM) para terminar a reação desfazendo o gradiente protônico estabelecido. As atividades de P- e V- H^+ -ATPase s foram diferenciadas pela adição dos inibidores específicos: 10 nM ConA para V- H^+ -ATPase e 200 μM ortovanadato de sódio para P- H^+ -ATPase. A atividade da P- H^+ -ATPase foi determinada pela diferença entre a atividade total e a atividade vanadato-insensível, e a atividade da V- H^+ -ATPase foi determinada pela diferença na atividade total e a atividade ConA-insensível, utilizando as fórmulas abaixo:

$$V_0 = [F_0 / (F_{\text{max}} \times t)] \times 100$$

$$\Delta F_{\text{max}} = (F_{\text{eq}} / F_{\text{max}}) \times 100, \text{ onde:}$$

V_0 , velocidade inicial de formação de $\Delta\text{pH}(\%)$;

F_0 , fluorescência dependente de V_0 num dado tempo (t), determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

F_{max} , fluorescência máxima (total);

t, tempo em minutos;

F_{eq} : fluorescência de equilíbrio determinada como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H^+ nas vesículas de membrana.

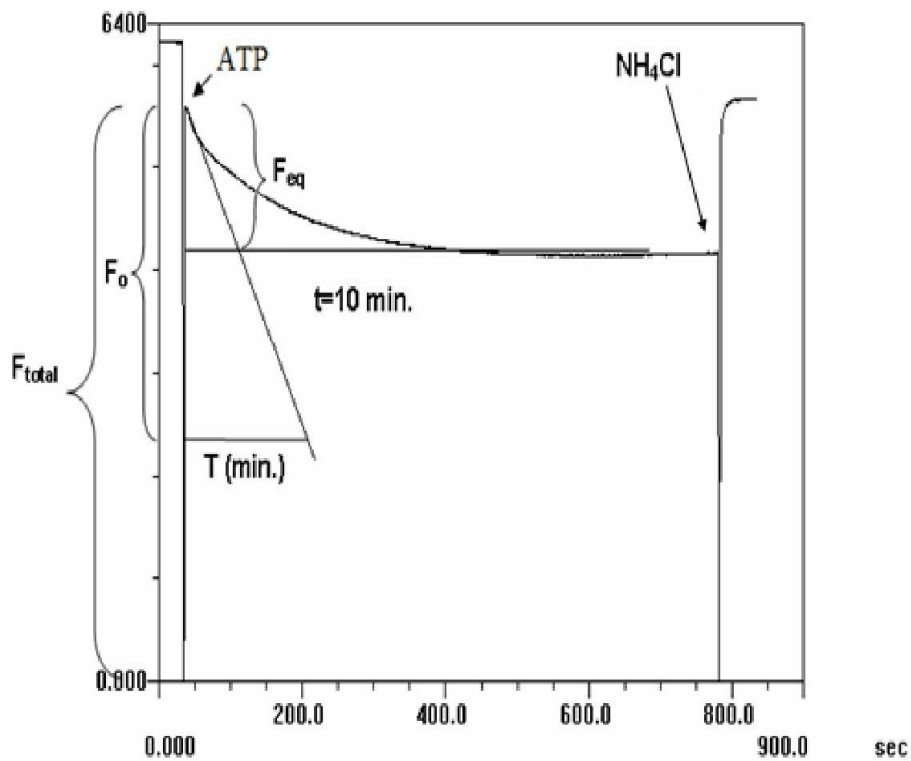


Figura 7: Representação esquemática da determinação da velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H⁺ em vesículas de membranas celulares. Velocidade inicial ($V_0 = [F_0 / (F_{max} \times t)] \times 100$); amplitude máxima ($\Delta F_{max} = (F_{eq} / F_{max}) \times 100$).

3.7 Atividade ATPásica de V-H⁺-ATPase em vesículas de membranas celulares

A atividade de hidrólise de ATP foi determinada pelo aumento da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) a partir do método descrito por Fiske e Subbarow (1925). Os ensaios foram realizados sob refrigeração, em tubos contendo tampão de hidrólise (sorbitol 100 mM; MOPS-KOH 30 mM; MgSO₄ 9,5 mM; molibdato de amônio 262 mM, pH 7,2); KCl 1 M; água destilada para completar 300 µL; volumes da suspensão de vesículas de membranas (diluídas previamente em tampão de hidrólise); ATP-NaOH 100 mM, pH 7.2. Em outras versões do experimento também foram utilizados os inibidores (22 nM concanamicina A; 200 µM ortovanadato de sódio; 5mM azida sódica). O meio de reação foi incubado a 30°C por 30 min. Após o tempo de incubação, a reação foi terminada com ácido tricloroacético 5% gelado (até completar 1 mL de volume de reação) e, em seguida, adiciona-se 2 mL da solução de revelação (ácido ascórbico 10% e molibdato de amônio 0,5%, relação 1:10) e incuba-se por 10 min a 30°C, seguindo imediatamente a leitura em espectrofotômetro para determinação de DO₇₅₀. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976) e as atividades foram normalizadas pela mg de proteína.

3.8 Ensaio de acidificação extracelular induzida pela glicose

Para análise indireta da atividade de H⁺-ATPases de membrana plasmática de *S. pombe* foi conduzido o ensaio de acidificação extracelular induzido por glicose, conforme descrito por Hemenway et al. (1995), com algumas modificações. Células de levedura cresceram em meio YES na ausência ou presença de rapamicina e fingolimode até o meio da fase logarítmica. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em água destilada. Após as lavagens, o peso das células foi determinado

e as células foram ressuspensas em água destilada, na concentração de 100 mg de peso úmido de células por mL, homogeneizadas e colocadas no gelo durante o experimento. Após esses procedimentos, foi preparada uma suspensão de células, contendo 4 mL de células lavadas e 14 mL de água destilada. O pH da suspensão foi ajustado com HCl diluído para 5,8, a 25 °C. Com o eletrodo de pHmetro mantido na suspensão celular e sob agitação constante na placa magnética, foi adicionado glicose a 20%, à suspensão no tempo 0 (para uma concentração final equivalente a 2 % glicose) e logo em seguida foi iniciada a medição do pH da suspensão, de 20 em 20 segundos, durante 25 min.

3.9 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar as diferenças entre os tratamentos e o controle no programa prism 8.1. As diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$) foram indicados por diferentes asteriscos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito de rapamicina e fingolimode no crescimento celular de *S. pombe*

Para avaliar o efeito da rapamicina e fingolimode no cultivo celular de *S. pombe*, as células da cepa selvagem (*wt*) e mutante deficiente de calcineurina (*ppb1*) foram cultivadas até atingir a fase estacionária (30h de cultivo) em meio líquido YES na presença de rapamicina numa faixa de concentrações 25 a 100 nM e fingolimode de 2 a 10 μ M. Os dois fármacos causaram inibição na proliferação celular, evidenciada pela diminuição da densidade ótica de suspensões celulares na presença de rapamicina e fingolimode (Figura 5). Os dados (apresentados na Figura 5A) mostram que a 50 nM rapamicina foi capaz de inibir aproximadamente pela metade o crescimento de ambas as cepas, enquanto 100nM rapamicina inibiu o cultivo em 70% (Figura 5A). Já para o cultivo com diferentes concentrações de fingolimode observamos que presença de 3 μ M fingolimode resultou em redução de cultivo em ~ 2 vezes tanto de *wt* como mutante *ppb1*, e que a concentração de 10 μ M inibiu fortemente o cultivo de *ppb1*, sendo considerada a concentração letal para as células de levedura (Figura 5B).

A quantificação da redução do crescimento após 30h mostra que cultivo com 50nM rapamicina resulta em inibição de 44% e 55% para cepas *wt* e *ppb1*, respectivamente, e 3 μ M fingolimode inibe em 47% e 56% (Figura 5C e D). De acordo com esses resultados as concentrações 50 nM 3 μ M foram escolhidas para os próximos ensaios. Destacamos que o crescimento da cepa *ppb1* é 2 vezes menor do que da cepa *wt* quando comparadas as culturas controles, indicando que deleção de calcineurina, especificamente subunidade catalítica Ppb1p, tem efeito negativo na proliferação celular em *S. pombe*. Porém essa deleção parece pouco afetar a sensibilidade da cepa *ppb1* a rapamicina e fingolimode (Figura 5).

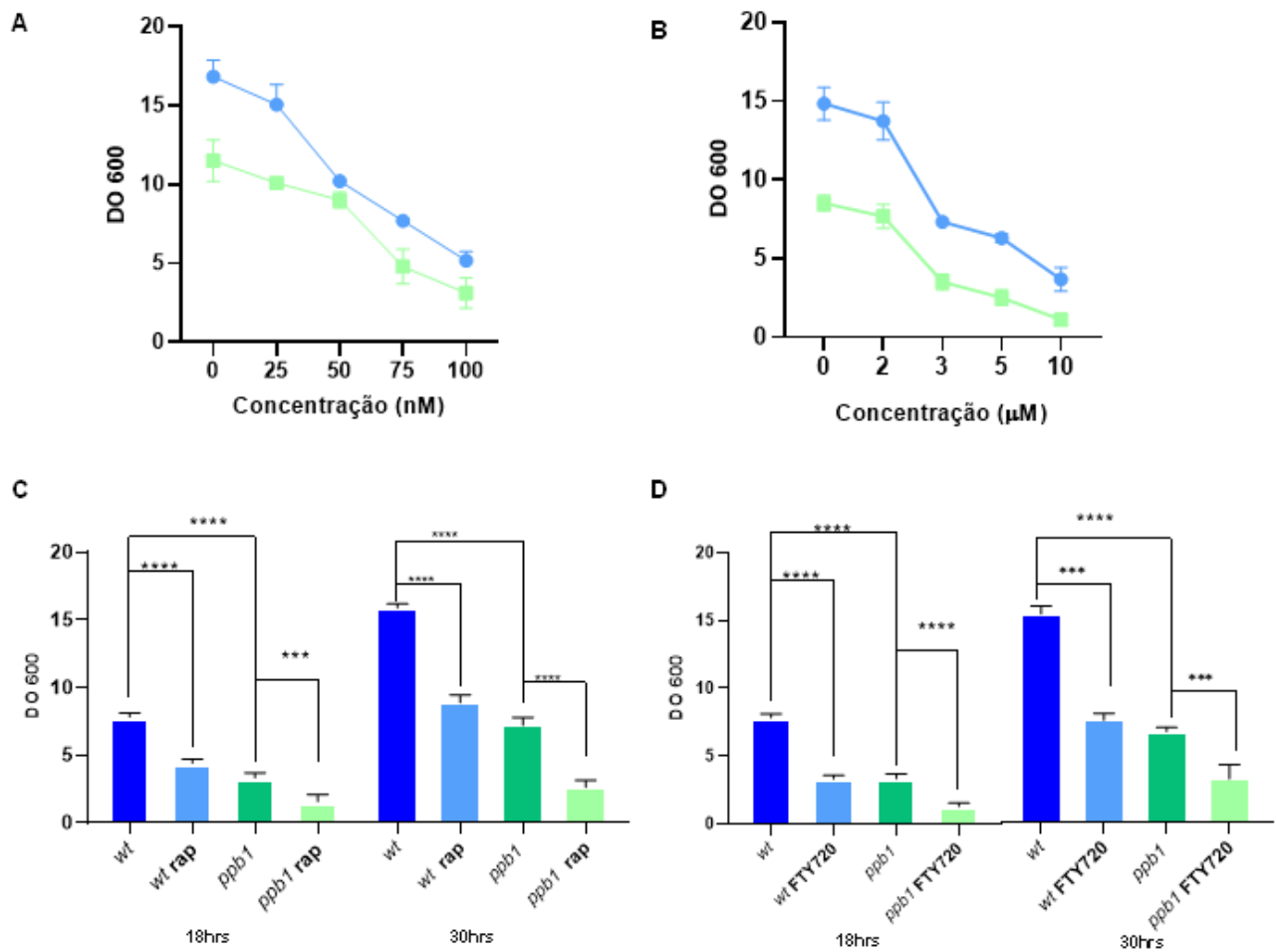


Figura 8: Efeito da rapamicina e fingolimode no cultivo de *S. pombe*. (A) e (B) Inibição do cultivo celular das cepas *wt* (●) e *ppb1* (■) dependente da concentração de rapamicina e fingolimode. As células do tipo selvagem (*wt*) e *ppb1* foram cultivadas em meio YES por 30h. (C) e (D) Quantificação do efeito inibitório de 50 nM rapamicina e 3 μM fingolimode no crescimento por 18 h e 30 h.

4.2 Efeito de rapamicina e fingolimode na morfologia celular de *S. pombe*

Para avaliar as possíveis mudanças na morfologia celular de *S. pombe*, realizamos análises de microscopia ótica. A Figura 6 mostra a morfologia típica de células *wt* em forma de bastão podendo apresentar 1 septo de divisão. A adição de 50nM de rapamicina ao meio de cultivo resultou em mudanças morfológicas, onde as células passaram a apresentar uma forma mais arredondada perdendo a morfologia de bastão, sugerindo alterações na polaridade celular. A cepa *ppb1* também apresentou as alterações quanto ao aumento do número de septos de 2 para 3 ou até 4.

A adição de 3μM de fingolimode nas culturas também resultou em diminuição de células formato bastão refletindo aumento de células com polaridade aberrante, causou diminuição do número de septos em *ppb1* resultando em diminuição de células multiseptadas características de *ppb1*.

A comparação quantitativa das alterações morfológicas na Tabela I mostra que ambos os fármacos interferem com a citocinese e polaridade, sendo que rapamicina exacerba ainda mais problemas com citocinese em mutante *ppb1* indicando importância de TOR na manutenção e regulação de citocinese na ausência de calcineurina. Pelo contrário, fingolimode diminuiu número de septos em *ppb1*, indicando que este fármaco ajuda superar defeito na citocinese permitindo que as células mutantes completam a divisão celular mesmo na ausência de calcineurina.

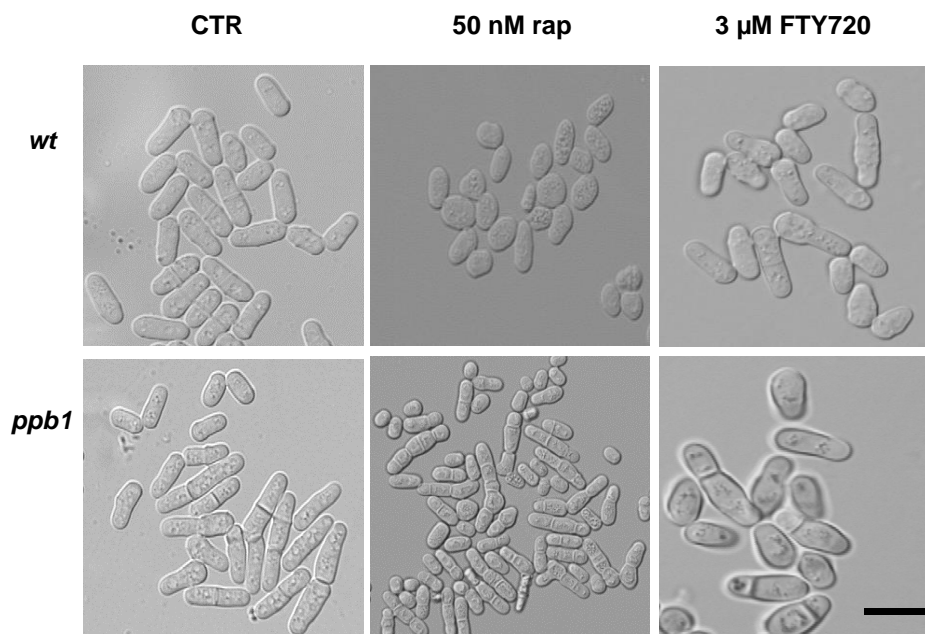


Figura 9: Efeito da rapamicina e fingolimode na morfologia das células de *S. pombe*. As células *wt* e *ppb1* foram cultivadas por 18h na presença de concentrações indicadas de fármacos. Barra representa 10 μ M.

Tabela 1: Efeito de rapamicina e fingolimode na polaridade celular e citocinese em *S. pombe*. Número total de células utilizadas para a quantificação, após 18h de cultivo, em cada tratamento foi 250 para *wt* e 200 para *ppb1*.

Parâmetros de Morfologia		Tratamento					
		wt ctr	wt rap	wt FTY720	ppb1 ctr	ppb1 rap	ppb1 FTY720
Formato das células	Bastão	100%	10%	30%	25%	10%	75%
	1	55%	0%	10%	70%	0%	20%
Número de septos/célula	2	0%	0%	0%	0%	10%	0%
	3	0%	0%	0%	0%	80%	0%
	4	0%	0%	0%	0%	10%	0%

4.3 Efeitos de rapamicina e fingolimode na dinâmica vacuolar

Visto que o alvo de rapamicina a proteína TOR se localiza na membrana dos vacúolos, avaliamos o efeito da rapamicina na organização vacuolar. A análise das células marcadas com sonda específica fluorescente FM4-64, que marca membrana vacuolar, revelou que culturas de células de *wt* sem tratamento apresentaram vacúolos arredondados, em sua maioria grandes, bem delimitados com média $5,0 \pm 0,5$ vacúolos por célula (média \pm erro padrão), enquanto as células *ppb1* apresentam vacúolos menores com média de $8 \pm 0,5$ vacúolos por célula (Figura 7 e 8), indicando que ausência de calcineurina resulta em aumento do número de vacúolos e/ou mudanças na dinâmica vacuolar.

Observamos que células *wt* na presença de 50 nM rapamicina exibem vacúolos fragmentados, pequenos e sobrepostos, ocupando grande parte do citoplasma, dificultando uma quantificação precisa. A contagem dos vacúolos revelou que a rapamicina promoveu aumento no número médio de vacúolos, chegando a $12 \pm 0,5$, com aumento de 2,8 vezes (Figura 7 e 8).

Uma média de $15 \pm 0,5$ vacúolos por célula foi quantificada em células *wt* cultivadas com 3 μ M de fingolimode (aumento de 3 vezes sem relação ao controle sem tratamento).

Já em mutante *ppb1* no tratamento com rapamicina e fingolimode observamos alterações no padrão de marcação da sonda FM4-64, observamos os vacúolos pequenos e sobrepostos não apresentando uma quantificação viável dificultando a contagem de vacúolos.

Esses dados mostram efeito semelhante de rapamicina e fingolimode em causar aumento e/ou fragmentação vacuolar em *S. pombe*, mesmo em mutante *ppb1* que já apresenta maior número de vacúolos em comparação com células *wt*, e sugerindo

que efeito desses dois fármacos na morfologia/dinâmica vacuolar independe da presença da calcineurina ou envolve outros alvos além de calcineurina.

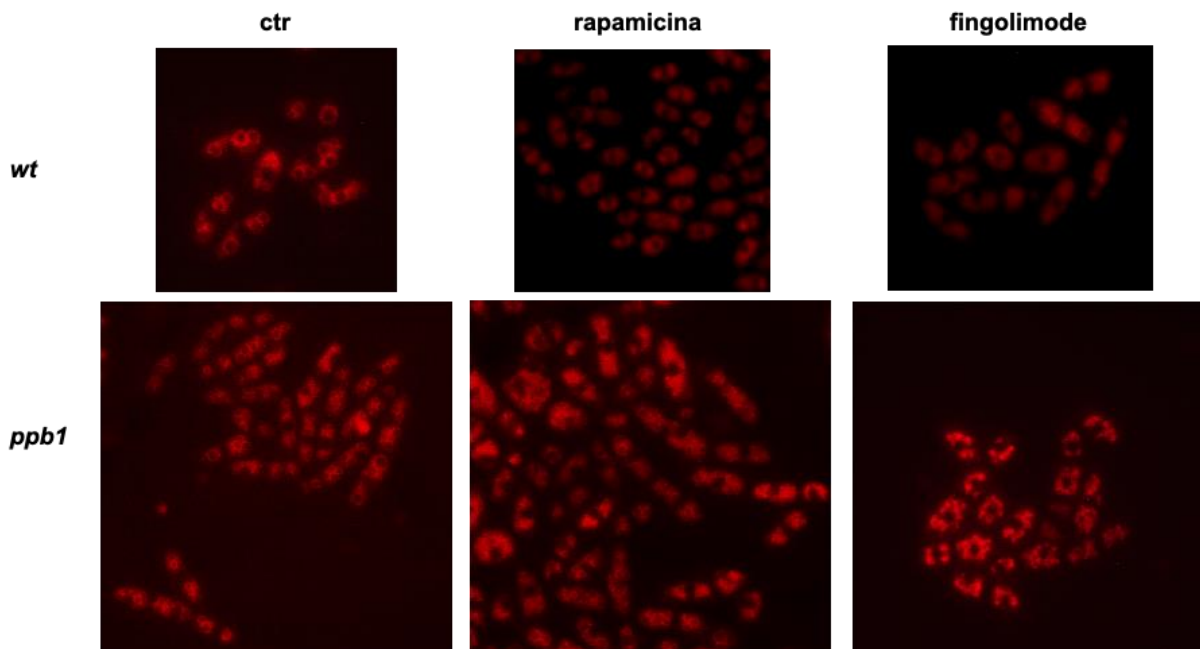


Figura 10: Marcação do vacúolo em células *S. pombe* com sonda fluorescente FM4-64. As células *wt* e *ppb1* foram analisadas após 16 h de cultivo em meio YES na ausência (CTR) ou presença de 50 nM rapamicina (rap) e 3 μ M fingolimode. Barras representam 10 μ m.

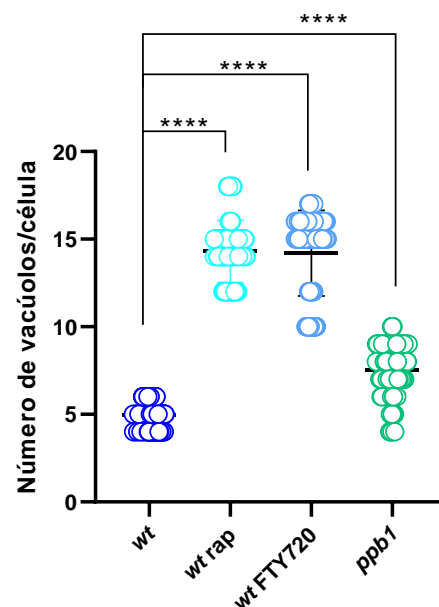


Figura 11: Análise estatística da quantificação de vacúolos em *S. pombe*. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey de múltipla comparação com $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0.0001$.

4.4 Efeito de rapamicina e fingolimode na atividade da V-H⁺-ATPase

A fim de verificar o efeito de rapamicina e fingolimode na atividade da V-H⁺-ATPase, realizamos o isolamento das membranas totais das células cultivadas na presença de rapamicina e fingolimode. O ensaio utilizando a sonda ACMA em vesículas membranares revelou que o transporte H⁺ ATP-dependente foi reduzido em células mutantes de calcineurina e também quando células foram cultivadas na presença de rapamicina e fingolimode.

A atividade de transporte mediada pela H⁺-ATPase tipo V em vesículas membranares foi calculado pela F_{max} da atividade total menos o F_{max} da atividade na presença de 22 μM de concanamicina A, inibidor específico da V-H⁺-ATPase (Figura 9). A análise comparativa da amplitude máxima e velocidade inicial do transporte de H⁺ ATP-dependente, revelou que tratamento com rapamicina e fingolimode resultou em redução semelhante (74% e 76% respectivamente) de F_{max} em células *wt* em relação ao controle (Figura 10) Uma redução de 80% e 79% foi observada para transporte de H⁺ em membranas das células *ppb1(B)* A velocidade inicial do transporte de H⁺ também apresentou sensibilidade a rapamicina e fingolimode, com 65% para ambos os fármacos em cerca de membranas *wt* e 80% para ambos em *ppb1*, (Figura 10 C e D).

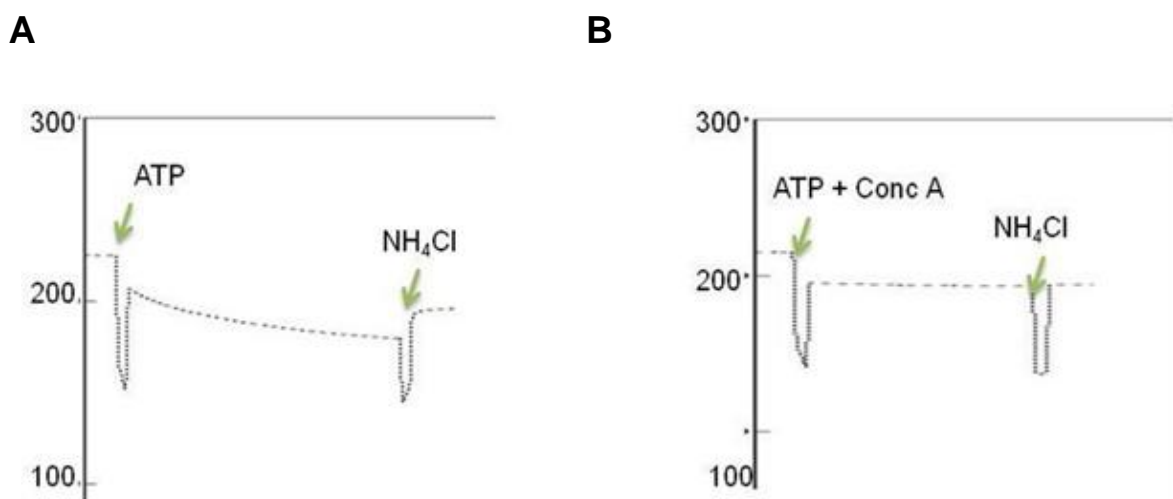


Figura 12: Cinética de decaimento da fluorescência da sonda ACMA durante o transporte de H⁺ ATP-dependente em vesículas de membranas isoladas de células *S. pombe* cultivadas com rapamicina e fingolimode. (A) Transporte de H⁺ ATP-dependente na ausência (A) e presença de inibidor específico 22 μM ConcA.

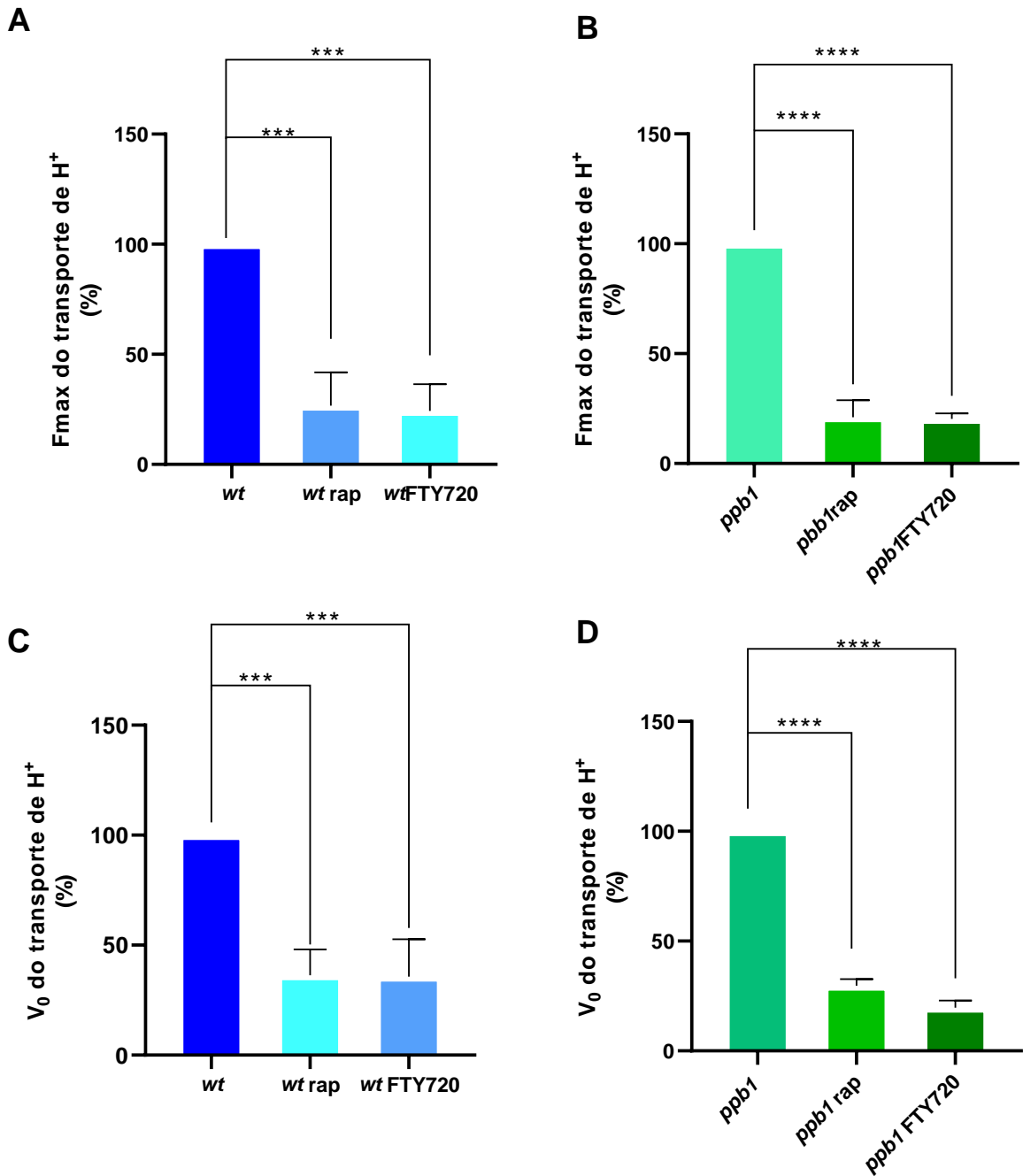


Figura 13: Atividade de V-H⁺-ATPase em membranas de *S. pombe*. (A, B) amplitude máxima e (C, D) a velocidade inicial de transporte de H⁺ mediado pela V-H⁺-ATPase em vesículas de membranas isoladas de células *wt* (A, C) e *ppb1* (B, D) cultivadas na presença de 50 nM rapamicina e 3 μM fingolimide. Valores representam a média de 4 isolamentos ± S. **** p ≤ 0.0001.

Avaliamos também atividade ATPásica de V-H⁺-ATPase em membranas de *S. pombe* isoladas de células que cresceram na presença de rapamicina e fingolimode. É possível observar na Figura 11A que na cepa *wt* a rapamicina reduziu a hidrólise de ATP em 1,3 vezes e na cepa *ppb1* observamos uma redução de 2,0 vezes. Observamos na Figura 11B que na cepa *wt* o fingolimode reduziu a hidrólise de ATP em 1,6 vezes e na cepa *ppb1* observamos uma redução de 2,1 vezes revelando que ambos assim como ocorreu com transporte de H⁺, também reduz a hidrólise de ATP o que leva a baixa atividade da bomba de V-H⁺-ATPase.

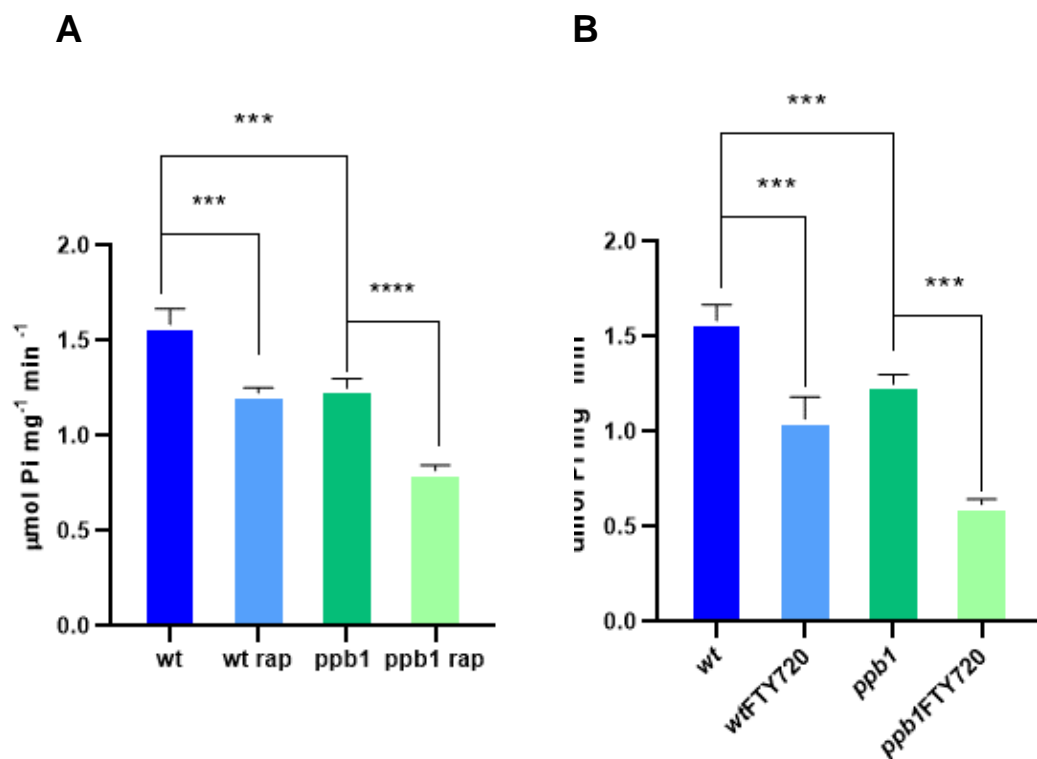


Figura 14:Atividade hidrolítica de V-H⁺-ATPase de *S. pombe*. As membranas celulares foram isoladas das células *wt* e *ppb1* após 18 hr de cultivo e usadas para determinação da atividade ATPásica. Valores representam a média de 4 isolamentos independentes ± S. **** p ≤ 0.0001.

4.5 Efeito de rapamicina e fingolimode na acidificação extracelular induzida pela glicose

Com o objetivo de avaliar o efeito de rapamicina, fingolimode e de calcineurina na atividade de H⁺-ATPase de membrana plasmática, a capacidade de acidificação do meio extracelular induzido pela glicose por células de *S. pombe*, cultivamos as células *wt* e *ppb1* na presença de 50 nM rapamicina e 3 μM fingolimode. As células foram ressuspensas em água (pH 5,8) e a extrusão de H⁺ para o meio extracelular foi disparada com glicose. As células *wt* apresentaram acidificação até o pH 3,9 em 25min, quando a acidificação do meio foi estabilizada (Figura 12A). Notavelmente as células *ppb1* não foram capazes de acidificar o meio tão efetivamente como células *wt*, com capacidade de acidificação caindo drasticamente em torno de duas vezes. Além disso, a acidificação estabilizou em 12 min. Esses resultados indicam a importância de calcineurina para ativação da H⁺-ATPase pela glicose.

As células cultivadas com rapamicina e fingolimode exibiram significativa redução da taxa de acidificação- 3,1 e 2,3 vezes respectivamente, para células *wt*, e 1,8 e 2,9 para células *ppb1* - além de alcançar rapidamente *steady-state* de saída/entrada de H⁺ em 10-12 min (Figura 12B-D), indicando que ambos os fármacos interferem na transdução de sinal para ativação da H⁺-ATPases de membrana plasmática em resposta a glicose.

Em conjunto, os dados sugerem a existência de pelo menos dois modos de ativação da H⁺-ATPases de membrana plasmática em resposta ao *sensing* de glicose, um dependente de cálcio/calcineurina fosfatase e outro dependente de kinase TOR.

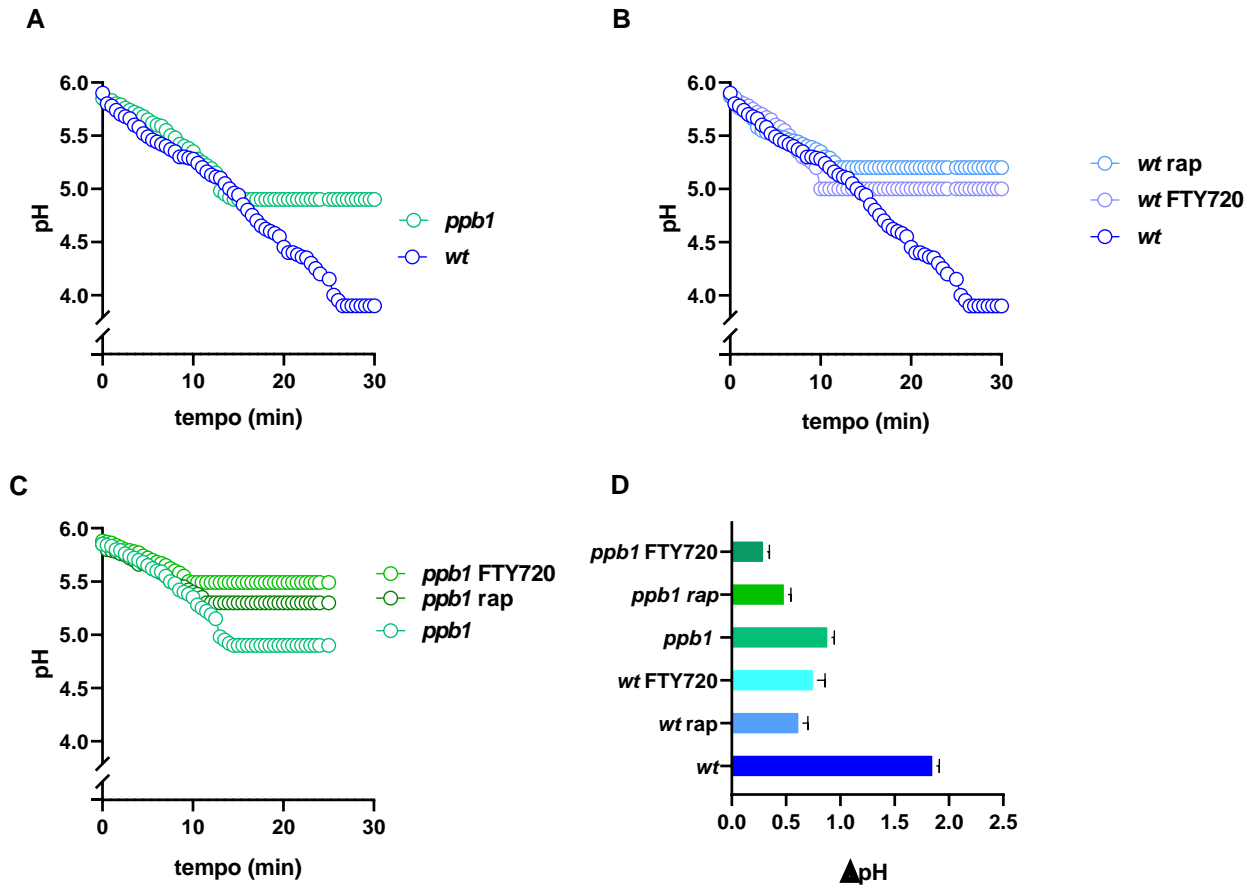


Figura 15: Ensaio de acidificação extracelular em resposta a glicose extracelular. (A) Comparação das curvas de acidificação entre as cepas *wt* e *ppb1*. (B, C) Comparação da acidificação pelas células *wt* (B) e *ppb1* (C) cultivadas com rapamicina e fingolimode. (D) Comparação de Δ pH da acidificação extracelular.

5. DISCUSSÃO

A levedura de fissão *S. pombe*, devido à sua simplicidade genética e semelhanças fundamentais com células eucarióticas superiores, tem sido amplamente utilizada para elucidar processos celulares complexos. A via de sinalização mTOR desempenha um papel crucial na regulação do crescimento e proliferação celular, integrando sinais ambientais e nutricionais. Por outro lado, a calcineurina, uma fosfatase dependente de cálcio, também desempenha funções essenciais na transdução de sinais celulares.

Halova e colaboradores (2021), demonstraram a presença de homólogos de componentes da via TOR em leveduras, com ênfase particular em *S. pombe*. A ativação da via TOR em leveduras de fissão está correlacionada com a modulação da síntese proteica, regulação do ciclo celular e adaptação a condições adversas. O delineamento preciso dos mecanismos moleculares pelos quais a levedura de fissão integra e responde a estímulos mTOR proporciona um campo promissor para avanços na compreensão da regulação celular em organismos inferiores.

A calcineurina, uma fosfatase altamente conservada, desempenha um papel essencial na regulação da resposta ao cálcio intracelular. Sua atividade está vinculada à ativação de vias de sinalização que afetam a proliferação celular, diferenciação e resposta imune. O desequilíbrio na atividade da calcineurina está associado a doenças autoimunes, cardiovasculares e neurológicas. A via mTOR em mamíferos é um regulador central do crescimento celular, controlando a síntese proteica, o metabolismo energético e a resposta ao estresse. Sua ativação é crucial para processos fisiológicos, mas também está implicada em diversas condições patológicas, incluindo câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas.

Halora e colaboradores (2021), apontam para uma interação intrincada entre mTOR

e a via de calcineurina. A ativação da calcineurina pode modular a via mTOR, influenciando a expressão gênica, a tradução e a homeostase celular. Além disso, a via mTOR pode afetar a atividade da calcineurina, sugerindo uma regulação cruzada que conecta diretamente essas duas vias críticas. Mecanismos moleculares específicos dessa interação estão sendo intensivamente investigados, incluindo a influência de fatores ambientais, como estresse celular e disponibilidade de nutrientes, na regulação conjunta de mTOR e calcineurina.

A ciclosporina e o tacrolimus são medicamentos imunossupressores que atuam inibindo a atividade da calcineurina. Esses medicamentos são utilizados no transplante de órgãos e no tratamento de certas doenças autoimunes para prevenir a ativação excessiva do sistema imunológico e evitar a rejeição de órgãos transplantados. Existem fármacos como a rapamicina e o fingolimode que atuam indiretamente inibindo a ação da calcineurina através da modulação do complexo Tor1 e a ativação e liberação dos linfócitos T respectivamente. Neste trabalho utilizamos a levedura de fissão *S. pombe* para compreender melhor os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo potencial imunomodulador da rapamicina e fingolimode.

Com objetivo de investigar os mecanismos de ação da rapamicina e do fingolimode como agentes antiproliferativos e anticancerígenos, realizamos análises com ênfase em crescimento, morfologia celular e a distribuição de organelas como vacúolos. Para começar demonstramos a toxicidade da rapamicina e do fingolimode em célula das cepas selvagem (*wt*) e mutante (*ppb1*) sendo dose dependente. O cultivo na presença rapamicina (Figura 5A e 5B) na faixa de concentração de 0 a 100 nM rapamicina e 0 a 10 µM fingolimode evidenciou que na concentração de 50 nM rapamicina houve uma inibição de 50% do crescimento e em 100 nM observamos uma

inibição de 70% para ambas as cepas. Enquanto para o fingolimode a concentração 10 μ M foi letal para as cepas.

Huynh e colaboradores (2023), testaram a rapamicina em linhagens tumorais de carcinoma hepatocelular e viram que teve uma redução de 47% no crescimento e proliferação. Tong e colaboradores (2021), viram que ao usar rapamicina associado a fármacos tradicionais para combater o *fungo C. albicans* obtiveram uma redução de 80% no crescimento do fungo. Cruz e colaboradores (2001), testaram a rapamicina em alguns fungos como *C. neoformans* e *S. cerevisiae* e constataram a função fungicida.

Najarzadegan e colaboradores usaram o fingolimode para combater infecções de *C. albicans*, demonstrando que o fingolimode possui efeitos antifúngicos contra *C. albicans*– tanto in vitro quanto in vivo. Nos modelos de camundongos com candidíase disseminada, esse efeito variou com base na relação cronológica entre a iniciação de fingolimode e inoculação *C. albicans*.

Girard e colaboradores, avaliaram e evidenciaram que o fingolimode apresentou uma eficácia significativa *contra S. aureus* e *S. epidermidis* quanto à sua capacidade de prevenir o crescimento planctônico e a formação de biofilme, bem como para romper biofilmes pré-formados. Uma análise de cinética time-kill revelou uma redução acentuada na contagem de bactérias viáveis em apenas duas horas, e notou-se a ausência de desenvolvimento de resistência ao composto por até 20 dias. Além disso, o fingolimode exibiu notável atividade *contra Acinetobacter baumannii*, com uma, e uma atividade moderada *contra Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Adicionalmente, foi observada a capacidade do fingolimode em inibir a detecção de quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*, indicando sua habilidade em modular essa via de sinalização em certas bactérias Gram-negativas.

A partir dos ensaios de MIC (concentração média inibitória) e observação do crescimento através da absorbância das culturas tratadas com os fármacos escolhemos as concentrações de 50 nM e 3 μ M rapamicina e fingolimode respectivamente (Figura 5C e 5D). Para quantificar a redução no crescimento ocasionada pelo tratamento com rapamicina e fingolimode cultivamos as cepas wt e *ppb1* por 18 e 30 horas e observamos que o efeito dos fármacos já pode ser evidenciado em 18hrs. Observamos que há redução no crescimento de 2,5 vezes quando comparamos as cepas na ausência dos fármacos, sugerindo que a ausência da calcineurina interfere também no desenvolvimento celular. Quando cultivamos a cepa wt com rapamicina e fingolimode a diminuição no crescimento é de 1,7 e 2,3 vezes respectivamente, enquanto para cepa mutante *ppb1* notamos uma redução de 2,1 e 2,6 vezes respectivamente no crescimento celular.

Para analisar a morfologia celular na presença dos imunomoduladores as células foram cultivadas na presença de rapamicina e fingolimode (Figura 6) e observamos que houve mudanças na morfologia típica das células de *S. pombe*, onde em células controle notamos o formato de bastão e com a presença de 1 septo. A adição de 50 nM rapamicina e 3 μ M fingolimode causou alterações. Na cepa wt quando cultivadas com rapamicina e fingolimode apresentaram morfologia anormal, sendo arredondadas e perda de septo, somente 10% (tabela 1) mantiveram a morfologia típica. Enquanto na cepa *ppb1* a rapamicina causou um aumento de 80% no número de septos. Mesmo sabendo que a característica normal da célula da cepa *ppb1* possuir mais de 1 septo, já o fingolimode causou alterações no formato da célula, onde as células eram alongadas e quando tratadas apresentam 75% no formato de bastão. Indicando que o cultivo com os imunossupressores causou problemas na citocinese e polaridade celular.

Yoshida e colaboradores (1994) observaram que a deleção do gene *ppb1* resulta em células com a morfologia anormal, multiseptadas e mais alongadas e que a temperatura mais baixa, como 22 C°, acentuaria esse efeito. Dados como este corroboram com o fenótipo encontrado nas cepas quando comparamos a morfologia entre cepa *wt* e cepa *ppb1*.

Liu e colaboradores (2022), demonstraram que ao adicionar rapamicina ao meio de cultivo reduziu o tamanho e a espessura das colônias consequentemente reduziu o crescimento das células *Yarrowia lipolytica*. Para Rallis (2013), estudos realizados com *S. pombe* demonstraram que as células perderam sua forma de bastão assumindo formato arredondado quando inibida a atividade do TORC1 através do ortólogo da isomerase FKBP12 Fkh1p, encontrada a levedura *S. pombe*. Inferindo que seus dados estabeleceria uma ação conservada da rapamicina na inibição TORC1. Corroborando com nossos dados, desta maneira podemos sugerir que a rapamicina afeta a progressão do ciclo celular, levando a um atraso na entrada nas fases de divisão celular. Além disso, a rapamicina pode modular a morfologia celular ao afetar a organização do citoesqueleto e a polaridade celular.

Para o fingolimode Barthelemy e colaboradores (2017) realizaram ensaios onde demonstraram a capacidade do fingolimode de endocitar transportadores de nutrientes levando as células de *S. cerevisiae* a baixar disponibilidade de nutriente e consequentemente uma redução na atividade de tor1. As células quando tratadas com fingolimode apresentam morfologia anormal, mudando do padrão broto convencional para um formato arredondado irregular. Hagihara (2013), demonstrou em células de *S. pombe*, mais especificamente em mutante da subunidade catalítica de calcineurina *ppb1*, apresentam uma sensibilidade maior ao fingolimode devido justamente a falta da ação da via de calcineurina e sendo assim estimulando o influxo de cálcio, sendo

assim apoiando nossos dados onde vemos que a cepa *ppb1* é mais sensível ao fingolimode.

Sabendo que o complexo TOR fica localizado na membrana do vacúolo/lissosomo e que tanto a rapamicina quanto o fingolimode reduzem a atividade de Tor realizamos ensaio de marcação vacuolar por meio da sonda fluorescente FM4-64 para analisar a dinâmica vacuolar.

O vacúolo é uma organela dinâmica, cuja morfologia responde de maneira significativa a diversos estímulos tanto extracelulares quanto intracelulares. Durante a fase logarítmica, as células metabolicamente ativas apresentam vacúolos compostos por múltiplos lóbulos de tamanho médio. Esses lóbulos se fundem, formando um vacúolo ampliado durante a fase estacionária ou em condições de privação de glicose. Um efeito mais pronunciado ocorre durante o estresse osmótico, resultando na fragmentação do vacúolo em várias pequenas vesículas.

Em contrapartida, a exposição a condições hipoosmóticas leva ao aumento do vacúolo, ocupando um grande volume na célula. As variações no tamanho e número desses compartimentos estão diretamente relacionadas à absorção ou liberação de água e íons do vacúolo.

O vacúolo deve ser capaz de receber tanto o lúmen quanto a carga associada à membrana das vesículas provenientes de várias vias de tráfego. Por outro lado, também deve ser capaz de enviar conteúdo de membrana/lúmen destinados a outros compartimentos. Um exemplo altamente coordenado disso é a herança vacuolar, onde parte do vacúolo mãe é particionada e direcionada para a célula filha em resposta a sinais do ciclo celular. Todos esses eventos celulares exigem um vacúolo flexível, capaz de alterar seu tamanho e conteúdo, mantendo a homeostase das organelas suficiente para sustentar a função normal. Nesse contexto, as membranas

vacuolares devem ser capazes de passar por fissão e fusão conforme necessário.

Observamos que em culturas sem os tratamentos, wt apresentou vacúolos grandes e com média de 5 vacúolos por célula, enquanto *ppb1* apresentou vacúolos pequenos e sobrepostos, dificultando a quantificação, com média de 8 vacúolos por célula resultando em um aumento de 1,6 vezes. Ao expor as culturas de *S. pombe* à rapamicina, ocorreram modificações na dinâmica de fissão/fusão vacuolar para as duas cepas, resultando em uma maior vacuolização nos tratamentos com 50 nM de rapamicina, com o aparecimento de diversos vacúolos pequenos, aumentando assim o número médio de vacúolos por célula. Evidenciando que o mecanismo que causa a fragmentação pela rapamicina é conservado em mutantes, como *ppb1*, aumentando a capacidade de fragmentação da cepa que já apresenta vacúolos fragmentados. Quando expostas ao fingolimide, houve um aumento na fragmentação vacuolar em ambas as cepas, passando de uma média de 5 vacúolos para 15 com um aumento de 3 vezes na cepa selvagem e de 8 vacúolos por célula para pelo menos 22 na cepa mutante, um aumento de 2,7 vezes. Os vacúolos de *S. pombe* são descritos na literatura por serem numerosos, pequenos e distribuídos de forma aleatória por toda a célula e que sofrem alterações morfológicas rapidamente quando a célula está sujeita ao estresse (Takegawa et al., 2003). Nossos resultados sugerem que ambos os imunomoduladores, possivelmente, afetam a fissão/fusão de vacúolos por meio do estresse resultante da perturbação na homeostase de cálcio e/ou outros íons relevantes para o funcionamento normal dos processos celulares.

Bone e colaboradores (1998), esclarecem que os vacúolos podem se fragmentar lentamente em resposta ao sal e alterações na osmolaridade, sendo que a fissão precisa a via Sty1 e Pmk1. Resultados obtidos por Lee e colaboradores (2012), revelam que células de *S. cerevisiae* apresentam vacúolos com estrutura fragmentada

no final da vida celular, uma vez que células em divisão celular normal, apresentam vacúolos que se fundem, originando um vacúolo grande, quando esta fusão falha, estruturas vacuolares fragmentadas são observadas na morte celular. Além disso, a fragmentação vacuolar também pode decorrer em função de desbalanço de cálcio celular. A primeira observação dessa relação foi realizada em mutante *pmr1* de *S. cerevisiae*, deficiente de Ca^{2+} -ATPase de Golgi que apresenta estresse do RE e níveis elevados de cálcio citoplasmático (Kellermayer et al., 2003). Desfougères e colaboradores (2016), explicam que a presença física da subunidade V0 da V-H⁺-ATPase é necessária para a fusão vacuolar. Enquanto Coonrod e colaboradores (2013), afirmam que a acidificação vacuolar induz a fusão vacúolo-vacúolo. Nesse contexto, nossos dados sugerem que a rapamicina possa alterar o pH vacuolar, interferindo diretamente na fusão dos vacúolos, através de modulações na V-H⁺-ATPase.

Normalmente, o fluxo constante de íons para dentro e fora das células é ajustado para acomodar os requisitos celulares, necessitando fino controle de homeostase iônica (Niu et al., 1995). Dessa forma, todos os processos biológicos são realizados de modo que as concentrações intracelulares de íons H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, Cl⁻, fosfato inorgânico (Pi), entre outros, permaneçam em condições ideais, as quais são mantidas pela atividade de transportadores primários como bombas prótonicas, transportadores secundários e canais iônicos (Voet et al., 2014)

Um dos fatores essenciais para o funcionamento correto destes organismos são as bombas de prótons ou H⁺-ATPases que transportam prótons contra a gradiente de concentração, utilizando a energia da hidrólise de ATP (Albert et al., 2009) formando um diálogo entre as substâncias transportadas e as bombas, como por exemplo do diálogo iônico entre os H⁺/ Ca²⁺ que é fundamental para várias vias de

sinalização celular.

A fim de avaliar as diferenças na homeostase de H^+ e no sistema de transporte primário de prótons, que tem as bombas tipo V e tipo P como principal mecanismo de atuação, foi realizado o fracionamento celular para a isolamento e obtenção de membranas totais. As quais foram utilizadas para experimentos que permitem medir e caracterizar como este transporte pode ser afetado nas cepas na presença e ausência de rapamicina e fingolimode.

A análise do transporte foi conduzida utilizando a sonda fluorescente ACMA que se liga aos H^+ que estão no lado externo da vesícula e em conjunto atravessam a membrana lipídica, desta forma as concentrações de H^+ e a sonda diminui no ambiente externo, resultando no decaimento da fluorescência. Quando comparamos as cepas wt e *ppb1*, detectamos uma redução de 2 vezes no transporte total, ou seja, sem a adição de concanamomicina A, o inibidor específico da V- H^+ -ATPase. Ao adicionar rapamicina e fingolimode, notamos uma redução no transporte total da cepa wt em 1,8 e 2,4 vezes respectivamente e na cepa *ppb1* a redução do transporte foi de 2,4 e 3,1 vezes para rapamicina e fingolimode, respectivamente.

O transporte de H^+ é reduzido drasticamente em ambas as cepas quando cultivadas com rapamicina, sugerindo que possa haver uma mudança conformacional nas bombas que impediria o transporte destes prótons através de membrana, ou um fator repressor que se ligue ao sítio onde os H^+ deveriam se ligar; outra sugestão seria o aumento da permeabilidade das membranas, não segurando o gradiente de H^+ , devido a alta concentração de Ca^{2+} intracelular, como resultado da ausência de calcineurina, que desequilibra a homeostase geral em células mutantes, que acabam por extravasar os H^+ que foram internalizados.

Em estudos realizados com mutantes de calcineurina em *S. cerevisiae* foi possível notar que o transporte de prótons também é reduzido assim como em mutantes de calcineurina de *S. pombe*, sugerindo que a calcineurina é um fator crucial para a ativação das bombas de prótons em leveduras (Teixeira,2016).

De acordo com Ribeiro e colaboradores (2012) A V-H⁺-ATPase pode ser ativada de forma reversível ou parcialmente inativada pela adição ou exaustão de glicose extracelular em leveduras e células animais, independentemente da sua localização nas membranas vacuolares ou plasmáticas. A regulação da atividade pela glicose extracelular assemelha-se à encontrada na P-H⁺-ATPase da levedura *S. cerevisiae*. Ambas as bombas H⁺ são moduladas em suas atividades sem a necessidade de nova síntese protéica, ocorrendo no pós-tradução. No entanto, a regulação da P-H⁺-ATPase, uma proteína integral da membrana plasmática, envolve modificações bioquímicas, mudanças na conformação, modulação da afinidade do ATP e sensibilidade ao seu inibidor vanadato. A regulação da atividade da V-H⁺-ATPase é alcançada considerando a completa dissociação/reassociação física de aproximadamente 60-70% dos grandes complexos catalíticos V1 com os complexos V0 da membrana, essenciais para o transporte de prótons.

Para analisar a acidificação extracelular, observamos que a adição de 2% de glicose, quando comparamos as cepas wt e *ppb1* a cepa *ppb1* não consegue alcançar a acidificação e só alcança 5 unidades de pH enquanto no selvagem que é 4 unidades. Indicando que o estímulo causado pela adição de glicose é reduzido em mutante, sugerindo que há problemas na ativação da ATPase de membrana plasmática pela ausência da calcineurina ou por haver uma quantidade menor de ATPases presentes quando comparada com células de cepa wt. Em células cultivadas com rapamicina e fingolimode esse estímulo é insipiente, sugerindo que ainda está ocorrendo a

atividade da bomba, mesmo que reduzida.

Quando observamos ambas as cepas na presença dos imunossupressores notamos que o efeito na não acidificação pode envolver mais do que somente a calcineurina.

Na figura 12B e 12C realizamos a adição de 50nM rapamicina e 3 μ M fingolimode notamos que também houve uma redução no estímulo após a adição de glicose e a capacidade de acidificação parou em 10 minutos para fingolimode e 12 minutos para rapamicina. Para uma melhor compreensão do processo de acidificação extracelular seria ideal realizar mais ensaios com diferentes concentrações. Na Figura 12D notamos que o Δ pH, ou seja, a capacidade de acidificação é reduzida em 2 vezes quando comparamos a cepa wt e *ppb1*, quando adicionamos rapamicina e fingolimode essa redução é de 3,0 e 2,8 unidades para cepa wt e 2,0 e 3,1 unidades para *ppb1* respectivamente.

A proteína quinase A (PKA), quando ativada pelo monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), exerce controle sobre a associação das subunidades V0 e V1. A glicose, por meio da sinalização, não apenas estimula a produção de cAMP, mas também ativa a via da PKA, desempenhando um papel crucial na regulação do crescimento e metabolismo celular. Além disso, a glicose desencadeia a fosforilação de GAD8 pela TORC2, ativando, assim, a bomba de prótons. Esse mecanismo adicional ressalta a complexidade e a interconexão das vias de sinalização envolvidas no controle preciso do crescimento e metabolismo. Sugerindo que a rapamicina e o fingolimode modulam mesmo que indiretamente a atividade das bombas de prótons do tipo V e P, uma vez que observamos a diminuição do transporte de prótons e a perda da capacidade de acidificação que é essencial para a ativação das bombas e que a calcineurina funciona como um fator de controle quando há o influxo de cálcio causado pelo fingolimode.

6. CONCLUSÕES

1. Os fármacos rapamicina e fingolimode interferem com a morfologia celular de *S. pombe*, causando alterações na citocinese e polaridade celular;
2. A cepa mutante deficiente de Ppb1p mostrou uma exacerbação dos efeitos por rapamicina e fingolimode, indicando que os imunossuppressores modulam a via dependente de calcineurina, além de sugerir uma correlação entre as vias TOR e CaN;
3. A rapamicina e o fingolimode aumentam a capacidade de fragmentação vacuolar em cepa mutante de calcineurina, sugerindo que este mecanismo é conservado mesmo na cepa mutante.
4. A rapamicina e o fingolimode inibem a atividade de transporte de prótons mediado pela V-H⁺-ATPase em membranas celulares, indicando a regulação da enzima pelas vias TOR e calcineurina.
5. Ativação da H⁺-ATPases de membrana plasmática pela glicose ocorre de duas formas, uma envolvendo via dependente da quinase TOR e outra envolvendo via de sinalização dependente de calcineurina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAO, J.-P.; LEGON, L.; RALLIS, C. Crosstalk between the mTOR and DNA Damage Response Pathways in Fission Yeast. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 305, 2 fev. 2021.

ANJUM, S. et al. Regulação mediada por TORC1 da integridade mitocondrial e homeostase de íons cálcio por Wat1 / mLst8 em *S. pombe*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 126907, 31 dez. 2023.

ASPURIA, P.-J.; SATO, T.; TAMANOI, F. The TSC/Rheb/TOR Signaling Pathway in Fission Yeast and Mammalian Cells: Temperature Sensitive and Constitutive Active Mutants of TOR. **Cell Cycle**, v. 6, n. 14, p. 1692–1695, 15 jul. 2007.

BARTHELEMY, C. et al. FTY720-induced endocytosis of yeast and human amino acid transporters is preceded by reduction of their inherent activity and TORC1 inhibition. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13816, 23 out. 2017.

BASTIDAS, R. J. et al. Rapamycin Exerts Antifungal Activity In Vitro and In Vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-Dependent Inhibition of Tor. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 3, p. 270–281, mar. 2012.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 517–529, jul. 2003.

CHEN, F. et al. The V-H⁺-ATPase s in cancer and cell death. **Cancer Gene Therapy**, v. 29, n. 11, p. 1529–1541, 2022.

CHIBA, K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 108, n. 3, p. 308–319, 1 dez. 2005.

COLLINS, M. P.; FORGAC, M. Regulation and function of V-H⁺-ATPase s in physiology and disease. **Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes**, v. 1862, n. 12, p. 183341, 1 dez. 2020.

CREAMER, T. P. Calcineurin. **Cell Communication and Signaling : CCS**, v. 18, p.

137, 28 ago. 2020.

CRUZ, M. C. et al. Rapamycin and Less Immunosuppressive Analogs Are Toxic to *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* via FKBP12-Dependent Inhibition of TOR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3162–3170, nov. 2001.

CUNNINGHAM, K.; FINK, G. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 3, p. 351–363, 1 fev. 1994.

DECHANT, R. et al. Cytosolic pH Regulates Cell Growth through Distinct GTPases, Arf1 and Gtr1, to Promote Ras/PKA and TORC1 Activity. **Molecular Cell**, v. 55, n. 3, p. 409–421, 7 ago. 2014.

GOFFEAU, A.; SLAYMAN, C. W. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, v. 639, n. 3, p. 197–223, 30 dez. 1981.

HALOVA, L. et al. A TOR (target of rapamycin) and nutritional phosphoproteome of fission yeast reveals novel targets in networks conserved in humans. **Open Biology**, v. 11, n. 4, p. 200405, [s.d.].

HARRIS, M. A. et al. Fission stories: using PomBase to understand *Schizosaccharomyces pombe* biology. **Genetics**, v. 220, n. 4, p. iyab222, 23 dez. 2021.

HOFFMAN, C. S.; WOOD, V.; FANTES, P. A. An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 403–423, out. 2015.

Homeostase de Ca²⁺ e H⁺ em leveduras de fissão: um papel da troca Ca²⁺/H⁺ e V-H⁺-ATPases distintas das organelas da via secretora - Okorokov - 2001 - FEBS Letters - Wiley Online Library. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2801%2902852-6?sid=nlm%3Apubmed>>. Acesso em: 4 fev. 2024.

HUYNH, H.; NG, W. H.; SOO, K. C. Everolimus Acts in Synergy with Vinorelbine to Suppress the Growth of Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 17, 19 dez. 2023.

INDRAWINATA, K.; ARGIROPOULOS, P.; SUGITA, S. Structural and functional understanding of disease-associated mutations in V-H⁺-ATPase subunit a1 and other isoforms. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, p. 1135015, 2023.

LEE, B. S. Regulation of V-H⁺-ATPase Expression in Mammalian Cells. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 2, p. 107–116, [s.d.].

LEFEBVRE, B.; BOUTRY, M.; MORSOMME, P. The Yeast and Plant Plasma Membrane H⁺ Pump ATPase: Divergent Regulation for the Same Function. Em: **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. [s.l.] Academic Press, 2003. v. 74p. 203–237.

LI, R.-J. et al. Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. **eLife**, v. 5, p. e19360, [s.d.].

LIU, Z. et al. Metabolome and Transcriptome Profiling Reveal Carbon Metabolic Flux Changes in *Yarrowia lipolytica* Cells to Rapamycin. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 939, set. 2022.

MASAKI, T.; SHIMADA, M. Decoding the Phosphatase Code: Regulation of Cell Proliferation by Calcineurin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1122, 20 jan. 2022.

NAJARZADEGAN, N. et al. Immunomodulatory drug fingolimod (FTY720) restricts the growth of opportunistic yeast *Candida albicans* in vitro and in a mouse candidiasis model. **PLOS ONE**, v. 17, n. 12, p. e0278488, 7 dez. 2022.

OBJECT, OBJECT. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. [s.d.].

OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; COGO, A. J. D.; PALMA, L. M. Role of P5A-Type ATPase in Ion Homeostasis and Signaling: Shedding Light on Obscure Pump. Em: CHAKRABORTI, S.; DHALLA, N. S. (Eds.). **Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-H⁺-ATPases and F-ATPases**. Springer International Publishing, 2016. p. 551–565.

PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. P-Type ATPases. **Annual Review of Biophysics**, v. 40, n. 1, p. 243–266, 2011.

RALLIS, C.; CODLIN, S.; BÄHLER, J. TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. **Aging Cell**, v. 12, n. 4, p. 563–573, ago. 2013.

RATTO, E. et al. Direct control of lysosomal catabolic activity by mTORC1 through regulation of V-H⁺-ATPase assembly. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4848, 17 ago. 2022.

RIBEIRO, C. C. et al. Extracellular Glucose Increases the Coupling Capacity of the Yeast V H⁺-ATPase and the Resistance of Its H⁺ Transport Activity to Nitrate Inhibition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49580, 26 nov. 2012.

RIVERA, A. et al. Enhanced fungal specificity and in vivo therapeutic efficacy of a C-22-modified FK520 analog against *C. neoformans*. **mBio**, v. 14, n. 5, p. e01810-23, [s.d.].

RIVERA, A.; HEITMAN, J. Natural product ligands of FKBP12: Immunosuppressive antifungal agents FK506, rapamycin, and beyond. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 1, p. e1011056, 12 jan. 2023.

SAMARÃO, S. S. et al. V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 2, p. 303–313, 1 fev. 2009.

SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. RAPAMYCIN (AY-22, 989), A NEW ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC II. FERMENTATION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 727–732, 1975a.

SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 727–732, out. 1975b.

TEIXEIRA, V. et al. Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1), Protein Kinase A (PKA) and Cytosolic pH Regulate a Transcriptional Circuit for Lipid Droplet Formation.

International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 16, p. 9017, 20 ago. 2021.

TOEI, M.; SAUM, R.; FORGAC, M. Regulation and Isoform Function of the V-H⁺-ATPase s. **Biochemistry**, v. 49, n. 23, p. 4715–4723, 15 jun. 2010.

TONG, Y. et al. Hyper-Synergistic Antifungal Activity of Rapamycin and Peptide-Like Compounds against *Candida albicans* Orthogonally via Tor1 Kinase. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 2826–2835, 8 out. 2021a.

TONG, Y. et al. Hyper-Synergistic Antifungal Activity of Rapamycin and Peptide-Like Compounds against *Candida albicans* Orthogonally via Tor1 Kinase. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 2826–2835, 8 out. 2021b.

VYAS, A. et al. Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: A Unicellular “Micromammal” Model Organism. **Current protocols**, v. 1, n. 6, p. e151, jun. 2021.

WEISMAN, R.; CHODER, M. The Fission Yeast TOR Homolog, *tor1+*, Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7027–7032, 9 mar. 2001.

YE, Q. et al. Structural basis of calcineurin activation by calmodulin. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2661–2667, 1 dez. 2013.

YOSHIDA, T.; TODA, T.; YANAGIDA, M. A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. **Journal of Cell Science**, v. 107 (Pt 7), p. 1725–1735, jul. 1994a.

YOSHIDA, T.; TODA, T.; YANAGIDA, M. A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 7, p. 1725–1735, 1 jul. 1994b.