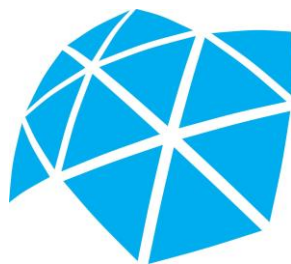


RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/06/2022.

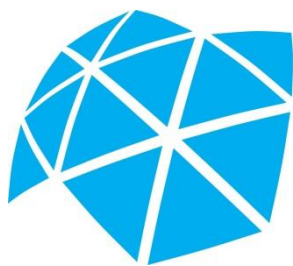


**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Modelagem do ciclo celular e influência dos lncRNAs em Saccharomyces cerevisiae expostas a altas concentrações de etanol.

Lucas Cardoso Lázari

**Botucatu – SP
2020**



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Modelagem do ciclo celular e influência dos lncRNAs em Saccharomyces cerevisiae expostas a altas concentrações de etanol.

**Mestrando: Lucas Cardoso Lázari
Orientador: Dr. Guilherme Targino Valente**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de mestre.

**Botucatu – SP
2020**

L431m Lázari, Lucas Cardoso
Modelagem do ciclo celular e influência dos lncRNAs em *Saccharomyces cerevisiae* expostas a altas concentrações de etanol. / Lucas Cardoso Lázari. -- Botucatu, 2020
117 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Guilherme Targino Valente

1. Modelagem. 2. Ciclo celular. 3. lncRNAs. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. Bioinformática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“There is a fine line between consideration and hesitation. The former is wisdom, the latter is fear. When the time comes to strike, an emperor strikes without hesitation, to entertain doubt is to dance with death’
- Izaro, Path Of Exile.

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo o apoio que tenho recebido desde sempre. Aos meus pais, Lígia Cruz Cardoso Lázari e Ovídio Lázari Júnior, por terem cuidado de mim sempre, por não terem deixado faltar nada e por toda motivação dada para eu seguir estudando. À minha irmã, Priscilla Cardoso Lázari, por todo o apoio e ajuda que me deu durante a faculdade e o mestrado, além de ser um exemplo de pessoa e profissional que eu tento seguir sempre. À minha avó, Lygia Prudente Cruz Cardoso, por toda a ajuda que recebi durante minha vida em Botucatu e também pelas visitas constantes. Tive muita sorte de tê-los na minha vida, tudo o que consegui fazer até hoje foi graças à ajuda e presença de vocês, sou muito grato! Vocês são muito importantes para mim, e eu espero poder ajudar mais vocês daqui para frente, da mesma maneira que vocês me ajudaram até hoje.

Agradeço aos meus amigos pela companhia quase diária. Principalmente ao pessoal do SBGL, que deixaram o meu período de mestrado muito mais agradável. Principalmente me forçando a sair de casa – uma tarefa extremamente difícil devido à inércia – para ir aos bares ou fazer qualquer outra coisa. Tenho que admitir que realizaram esse feito com excelência.

Agradeço ao meu orientador, Guilherme Targino Valente, por ter me ajudado a crescer profissionalmente e pessoalmente. Agradeço pelas críticas construtivas e feitas sempre com o intuito de me ajudar a crescer como cientista. Você foi a primeira pessoa durante o período acadêmico que realmente me ajudou a corrigir alguns dos (vários) erros que eu nem sabia que tinha, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. A sinceridade das conversas que você tinha comigo foi essencial para tudo isso acontecer. Somente através de um diálogo sincero que é possível diagnosticar os erros e corrigi-los, e sou grato por todas as conversas sinceras que tivemos (embora o meu ego tenha saído ferido na maior parte das vezes, mas ninguém é de ferro, né?). Te admiro como pessoa e como cientista.

Agradeço também a todos os professores da UNESP, principalmente ao professor Rafael Plana Simões, que me ajudou bastante durante o período de mestrado.

Agradeço ao Acaso, pois tudo que tive até hoje foi resultado de muita sorte. Nasci em uma família excelente, tive tudo o que sempre precisei, oportunidades nunca faltaram, tenho amigos muito especiais, trabalhei com pessoas ótimas e não tive nenhum problema causado por puramente azar (apenas os problemas que eu mesmo criei, infelizmente mais do que deveria ter criado, confesso). O Acaso me favoreceu muito ao longo da minha vida, e continuou favorecendo ultimamente. Sinceramente, espero que continue favorecendo no futuro, pois minhas habilidades de planejamento são bem ruins e nem só de bom humor vive o homem.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pois através dessa universidade pública fui capaz de me graduar e realizar um mestrado. Sou muito grato pela sua existência e espero poder retribuir à sociedade todo o conhecimento obtido.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro fornecido durante meu período de mestrado. Sem ele eu não seria capaz de me manter durante dois anos aqui em Botucatu, portanto não seria capaz de fazer um mestrado.

Agradeço às intempéries que criei (sem querer, obviamente), pois só a partir do processo de solução delas fui capaz de evoluir como pessoa e identificar que o que mais me prejudicava era uma pequena má interpretação da terceira lei de Newton. De forma geral, agradeço às coisas por serem da maneira que são.

Resumo

A intensa utilização de combustíveis fósseis gera preocupações constantes devido aos impactos de sua combustão ao meio ambiente. Os biocombustíveis são uma alternativa viável aos combustíveis fósseis por apresentarem vantagens como serem menos agressivos ao meio ambiente. O bioetanol é um dos biocombustíveis mais utilizados no mundo e sua produção pode ser feita pela fermentação realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, altas concentrações de etanol inibem diversos mecanismos biológicos da levedura, causando a diminuição da produtividade. A partir de resultados prévios, observou-se que o ciclo celular é uma das vias mais afetadas pelo etanol e, além disso, constatou-se a presença de lncRNAs regulando esta via em duas linhagens de *S. cerevisiae*, a BY4742 e SEY6210. Utilizando operadores Booleanos, um modelo lógico discreto foi desenvolvido para o ciclo celular no qual os nós do sistema assumem até quatro valores discretos que representam a quantidade ou o grau de ativação desses nós. O modelo desenvolvido apresentou boa performance preditiva, acertando 87.27% dos 109 fenótipos obtidos da literatura, tornando possível a simulação de novos elementos. Experimentos prévios demonstraram que as leveduras de baixa tolerância ao etanol conseguem retomar o crescimento mais rápido do que as de alta tolerância. Nesse trabalho, simulações feitas com dados de expressão diferencial via RNA-Seq permitiu inferir que isso ocorre porque as linhagens de baixa tolerância sofrem *arrest* na última fase do ciclo celular (fase M), enquanto que as mais tolerantes sofrem *arrest* na primeira fase (fase G1). Os resultados também indicaram que na linhagem SEY6210 (baixa tolerância) a presença de um lncRNA superexpresso permite que esta linhagem complete o ciclo sem sofrer *arrest*. Até o momento, o modelo aqui desenvolvido contempla o maior número de proteínas do ciclo celular.

Palavras-chave: Modelagem lógica, Bioinformática, Ciclo celular, *Saccharomyces cerevisiae*, RNAs longos não codificantes, Tolerância ao etanol

Abstract

The intense use of fossil fuels raised concern about the future due to their negative environmental impact. Bio-fuels are alternatives to the fossil fuels due to be biodegradable and less environmentally harmful. The bio-ethanol is one of the most popular bio-fuel. It can be produced by fermentation using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, high ethanol concentration inhibits the yeast decreasing the ethanol yield. Previous data of our groups showed the cell cycle is one of most affected pathways during ethanol stress. Moreover, it was found lncRNAs regulating this pathway in the BY4742 and SEY6210 strains. Using Boolean operators the discrete logical model of the cell cycle was developed. The nodes may get up to four discrete values to represent their abundance of activation degree. This model correctly modeled around 87.27% of correct predictions based on 109 phenotypes from the literature, hence, this model is desirable to predict cell cycle behavior after addition of new elements. According to previous data of our group, the lower tolerant strains recover the normal growth faster than higher tolerant strains after stress relief. The simulations here presented by adding RNA-Seq information into the model, showed a cell cycle arrest at final phase of the cell cycle (M phase) in lower tolerant strains whereas in the higher tolerant ones this arrest occurs at the first phase (G1 phase) during the ethanol treatment. The simulations also indicated that in SEY6210 (low tolerant), the up-regulation of a lncRNA skips the M phase arrest. Finally, this model harbor the highest number of cell cycle's proteins already modeled.

Keywords: long non-coding RNAs, Logical modeling, Cell cycle, Ethanol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*, Bioinformatics

Índice de ilustrações

Figura 1: Sequência de transformações da glicose até o produto final de interesse, o etanol.....	13
Figura 1: Modelo representando as interações entre proteínas do ciclo celular em <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 2: Estrutura do sistema que será modelada pelas equações Booleanas escritas para cada componente da rede.....	31
Figura 3: Grafo de transição de estados de todas as trajetórias do sistema.....	32
Figura 4: Modelo desenvolvido por Li et al. (2004).....	34
Figura 5: Modelo desenvolvido por Fauré et al. (2009).....	36
Figura 6: Modelo de Irons (2009)	38
Figura 7: Estrutura do modelo do ciclo celular desenvolvido por Todd e Helikar (2012).....	40
Figura 8: Estrutura do modelo criado por Alcasabas et al. (2013).	42
Figura 9: Modelo desenvolvido por Rubinstein et al. (2013).....	44
Figura 10: Modelo do ciclo celular desenvolvido nesta dissertação	50
Figura 11: Fluxograma da criação do modelo lógico, adaptado de Wang et al. (2012).....	56
Figura 12: Distribuição do fold-change de todos os transcritos das seis linhagens.....	59
Figura 13: Simulação no modelo de uma levedura wild-type (WT) sem nenhuma perturbação ou checkpoint ativo.....	65
Figura 14: Resultado obtido com a simulação dos dados de transcriptoma das leveduras do grupo HT	71
Figura 15: Resultado obtido com a simulação dos dados de transcriptoma das leveduras do grupo LT as quais, diferente das HTs, sofreram um arresto no final de M.....	71
Figura 16: Resultado obtido para a simulação do lnc_9136 superexpresso no fenótipo LT	73
Figura 17: Resultado obtido pela simulação com a superexpressão constitutiva do lnc_10883 em uma levedura com alto dano ao fuso.	78
Figura 18: Resultados do docking molecular do lnc_9136 com Hsl1p	79
Figura 19: Resultados do docking molecular do lnc_9136 com Gin4p	79
Figura 20: Resultado da predição de estrutura 3D para o lnc_9136.....	81
Figura 20: Resultado obtido pela simulação com a superexpressão constitutiva do lnc_10883 e lnc_9136 como inibidores da ORC	85
Figura 21: Proteínas da sub-rede encontrada na linhagem BMA64-1A.....	96
Figura 21: Simulações do modelo para cada situação.....	98

Índice de tabelas

Tabela 1: Produção de bioetanol de diferentes países no período de 2014-2015	12
Tabela 2: Produção de bioetanol em milhões de galões de 2007 a 2013.....	12
Tabela 3: Principais efeitos do excesso de etanol em leveduras.....	14
Tabela 4: Valores correspondentes à quantidade de genes diferencialmente expressos para cada linhagem	16
Tabela 5: Termos de GO obtidos utilizando os genes diferencialmente expressos (tanto superexpressos quando subexpressos) das linhagens HT e LT.....	16
Tabela 6: Dados de expressão não discretizados utilizados no modelo para diferenciar o fenótipo HT de LT.....	60
Tabela 7: Porcentagem de células que acumulam dano ao DNA.....	63
Tabela 8: Valores de fold-change para cada gene do <i>checkpoint</i> do dano ao DNA para cada linhagem.....	64
Tabela 9: Resultados obtidos da matriz de confusão.....	66
Tabela 10: Algumas mutações testadas no modelo para a validação.	68

Sumário

1. Introdução	11
1.1. Bioetanol	11
1.2. Produção de bioetanol por leveduras	13
1.3. Ciclo celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.4. Modelagem matemática na biologia e modelos do ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i>	25
1.5. LncRNAs e suas funções	45
2. Justificativa e objetivos	47
2.1. Objetivos gerais	48
2.2. Objetivos específicos	48
3. Métodos	49
3.1. Definições	49
3.2. Desenvolvimento do modelo lógico	50
3.3. Validação do modelo	57
3.4. Testes dos dados de transcriptoma	59
3.5. <i>Docking</i> molecular	62
3.6. Efeitos do dano ao DNA para cada linhagem	63
3.7. Efeitos dos lncRNAs no complexo ORC	64
4. Resultados e Discussões	64
4.1. Validação do modelo	64
4.2. Simulação dos grupos HT e LT	69
4.3. <i>Docking</i> molecular da interação lnc_9136-Hsl1p/Gin4p	78
4.4. Efeito do dano ao DNA no ciclo celular em cada linhagem	82
4.5. Efeito dos lncRNAs no complex ORC	84
5. Conclusões	85
6. Referências	88
Apêndice 1 – Análise quantitativa	96

1. Introdução

Neste tópico serão abordados os temas relacionados a esta pesquisa com o intuito de demonstrar sua relevância e prover aos leitores informações suficientes para compreender o trabalho. Portanto, será feita uma revisão sobre bioetanol e seu papel no cenário econômico e ambiental atual, seguido por explanações do funcionamento do ciclo celular em *Saccharomyces cerevisiae* e sua relação com a produção de etanol. Dessa forma, será possível compreender como a modelagem pode ajudar no estudo do ciclo celular e, conseqüentemente, na melhora da produção do bioetanol. Uma revisão sobre modelagem matemática de redes também é apresentada para demonstrar suas funções no estudo de sistemas complexos e como ela pode ser útil para este fim. Finalmente, uma revisão sobre RNAs Longos Não Codificantes (lncRNAs) também está presente neste texto, permitindo compreender o papel deles no modelo e como eles podem afetar a função de proteínas.

1.1. Bioetanol

A intensa utilização de combustíveis fósseis demandada pela necessidade de desenvolvimento econômico dos países tem causado uma diminuição progressiva na disponibilidade destes recursos não renováveis gerando problemas econômicos e políticos e tende a piorar em longo prazo. Além disso, é consenso na literatura que estes combustíveis são a principal causa das mudanças climáticas (RASS-HANSEN et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2015). As preocupações acerca do futuro dos combustíveis fósseis e o entendimento dos impactos de sua combustão ao meio ambiente torna necessário o estudo de combustíveis alternativos, procurando aqueles que sejam renováveis e menos agressivos ao meio ambiente. Os biocombustíveis são uma alternativa viável e apresentam vantagens quando comparados aos combustíveis fósseis, tais como: 1- são extraídos de biomassa; 2- são biodegradáveis e, portanto, mais sustentáveis; 3- sua combustão não interfere no ciclo do dióxido de carbono; 4- são menos agressivos ao meio ambiente (GAURAV et al., 2017).

Atualmente, os biocombustíveis mais comuns incluem o bioetanol e biodiesel. A produção destes combustíveis é proveniente das plantações de cana-de-açúcar, beterraba, soja, batata, entre outras (GHADIRYANFAR et al., 2016). O bioetanol é um dos biocombustíveis mais utilizados no mundo, principalmente pela possibilidade de misturá-lo com a gasolina, diminuindo o custo do produto e as emissões de CO₂ (diminuição de 90% das emissões de CO₂ e 60-80% de SO₂ quando misturado com 95% de gasolina) (GUPTA; VERMA, 2015).

No contexto global, há sempre uma tendência de aumento na produção de etanol ao longo dos anos, sendo o Brasil e Estados Unidos líderes na produção de etanol (Tabela 1 e Tabela 2) (NIPHADKAR; BAGADE; AHMED, 2018).

Tabela 1: Produção de bioetanol de diferentes países no período de 2014-2015 (adaptado de Niphadkar et al., 2018).

País	Bioetanol em milhões de galões (valor aproximado)
EUA	15.000
Brasil	65.000
Europa	1.369
China	695
Índia	555
Canadá	522
Tailândia	310
Argentina	160
Outros	726

Tabela 2: Produção de bioetanol em milhões de galões (valor aproximado) de 2007 a 2013 (adaptado de Niphadkar et al., 2018).

País	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
EUA	6.521	9.309	10.938	13.298	13.948	13.000	13.300
Brasil	5.019	6.472	6.578	6.922	5.573	5.577	6.267
Europa	570	734	1.040	1.209	1.168	1.179	1.371
China	486	502	542	542	555	555	696
Canadá	211	238	291	357	462	449	523
Outros	315	389	914	985	698	752	1272

O Brasil foi recentemente considerado líder global na produção e desenvolvimento tecnológico do bioetanol. Atualmente, é o maior produtor de etanol a partir da cana-de-açúcar. No entanto, como apontado nas tabelas acima, os EUA lidera a produção, sendo que somada à produção brasileira atingem 85% da produção mundial de etanol (SALLES-FILHO et al., 2017). Portanto, visto que o etanol tem uma grande importância econômica e ambiental, é essencial estudar maneiras de aumentar sua produção, melhorando assim a sua competitividade frente aos combustíveis fósseis.

1.2. Produção de bioetanol por leveduras

A produção de bioetanol provém da capacidade das leveduras e outros micro-organismos em converter moléculas de seis carbonos em moléculas de dois carbonos, gerando CO₂ e etanol em vez de lactato, como ocorre nos seres humanos. O processo se inicia na glicólise, a qual a glicose é degradada por uma série de enzimas gerando duas moléculas de piruvato. Os piruvatos são então descarboxilados pela piruvato-descarboxilase formando aldeído, o qual é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (Figura 1) (NELSON; COX, 2014).

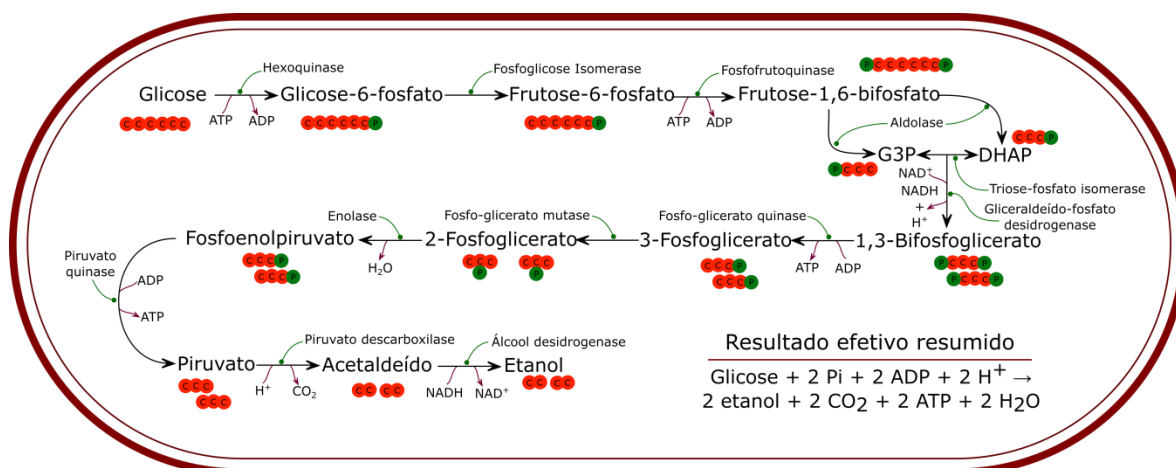


Figura 1: Sequência de transformações da glicose até o produto final de interesse, o etanol. As esferas em laranja e verde representam, respectivamente, o fluxo de carbono e grupos fosfato ao longo do processo.

Dentre as leveduras disponíveis para a produção do bioetanol, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais comumente utilizada. Embora ela seja capaz de produzir etanol com

alto rendimento, a levedura passa a sofrer estresse com o aumento da temperatura e concentração de etanol durante o processo fermentativo, causando perdas da viabilidade celular e diminuição do crescimento (MOHD AZHAR et al., 2017).

O etanol em baixas concentrações já é capaz de inibir o crescimento celular, enquanto que em altas concentrações os efeitos tóxicos do etanol passam a ser mais severos, aumentando a taxa de morte celular do micro-organismo e reduzindo sua vitalidade (atividade e metabolismo da célula) (HU, X. H. et al., 2007). Também, pode causar modificações no metabolismo celular, na biosíntese de macromoléculas, diminuição produção de RNAs e proteínas, aumento na frequência de mutações e alteração na viabilidade e atividade de proteínas intracelulares (Tabela 3) (STANLEY et al., 2010).

Tabela 3: Principais efeitos do excesso de etanol em leveduras (adaptado de Stanley et al., 2010).

Viabilidade e crescimento celular	Inibição do crescimento, da divisão celular e de sua viabilidade; Diminuição do volume celular.
Metabolismo	Diminuição nos níveis de mRNAs e proteínas; Desnaturação e redução de atividade de proteínas; Estímulo para produção de proteínas de resposta ao estresse.
Estrutura celular e função de membrana	Alteração na morfologia do vacúolo; Inibição da endocitose; Perda de gradiente eletrostático e força próton motriz; Inibição de processos de transporte; Inibição da atividade H ⁺ -ATPase; Aumento na fluidez de membrana.

Os mecanismos de resposta ao estresse causado pelo etanol são extremamente complexos e afetam uma variedade enorme de genes e proteínas. Chandler et al. (2004) demonstraram que após uma hora de exposição ao etanol, um total de 374 genes tiveram sua transcrição alterada, sendo que 100 genes apresentaram aumento de transcrição enquanto que 274 tiveram uma diminuição. O número de genes desregulados varia de acordo com o tempo de exposição: após três horas de exposição ao etanol o número de

genes superexpressos caiu para 14, e o número de genes subexpressos caiu para 99 (CHANDLER et al., 2004).

No trabalho publicado por Teixeira et al. (2009), 254 genes foram identificados como responsáveis por atuarem na resistência ao etanol. Analisando a ontologia desses genes candidatos, o grupo identificou que a maioria deles está relacionada com os termos: 1- organização e biogênese celular; 2- estabelecimento da localização celular; 3- transporte intracelular; 4- biogênese e organização de organelas; 5- transporte vacuolar; 6- organização e biogênese de peroxissomos; 7- direcionamento de proteínas para o peroxissomo; 8- biogênese e organização do endossomo; 9- transcrição pelo promotor da RNA polimerase II; 10- biogênese e organização do citoesqueleto (TEIXEIRA et al., 2009).

Ambos os trabalhos apresentados acima utilizaram dados de *microarray* para a identificação de genes importantes para o mecanismo de resistência ao etanol. Conforme o exposto, é possível observar a complexidade desse mecanismo, portanto, estudá-los e encontrar maneiras de desenvolver leveduras cada vez mais resistentes é ainda um desafio para a comunidade científica.

A complexidade fica ainda mais evidente quando tratamos de dados de RNA-Seq, nos quais a quantidade de dados é claramente muito maior. Wolf (2019), obteve o transcriptoma de 6 linhagens de *S. cerevisiae* tanto na condição controle (sem exposição à altos níveis de etanol) quanto tratada. No tratamento citado, foi determinada a quantidade máxima de etanol tolerada para cada linhagem, permitindo separá-las em grupos de alta tolerância (HT) e baixa tolerância (LT) ao etanol (ALMEIDA, 2017). Observou-se que, em média, 50.31% dos genes diferencialmente expressos estão superexpressos e 49.68% estão subexpressos nas HTs, enquanto que nas LTs esse número é de 47.76% e 52.23% respectivamente (Tabela 4). A análise dos GOs dos genes diferencialmente expressos reporta um total de 2.672 termos, os quais foram sumarizados para encontrar os termos que fossem mais relevantes no contexto de resistência ao etanol (Tabela 5) (WOLF, 2019).

Tabela 4: Valores correspondentes à quantidade de genes diferencialmente expressos para cada linhagem (WOLF, 2019).

Linhagem	Grupo	Superexpressos	Subexpressos	Total
BMA64-1A	HT	1319	1240	2559
BY4742	HT	2050	2117	4167
X2180-1A	HT	2144	2126	4270
S288c	LT	2277	2552	4829
BY4741	LT	2116	2256	4372
SEY6210	LT	1640	1795	3435

Tabela 5: Termos de GO obtidos utilizando os genes diferencialmente expressos (tanto superexpressos quando subexpressos) das linhagens HT e LT (WOLF, 2019).

	Alta tolerância	Baixa tolerância
Superexpressos	Energia proveniente da oxidação de compostos orgânicos; Resposta a substâncias tóxicas; Metabolismo de cofatores; Metabolismo de carboidrato celular; Metabolismo de carboidratos; Geração de metabólitos precursores e energia; Metabolismo da coenzima de oxidorredução; Metabolismo composto contendo pirimidina; Reenovelamento de proteínas.	Transporte por transmembrana; Crescimento celular;
Subexpressos	Reparo de rupturas na dupla fita; Mudança na estrutura do DNA; Segregação cromossômica; Regulação biológica; Processos celulares.	Metabolismo de tRNAs; Transporte de RNAs; Biogênese de complexos de ribonucleoproteínas; Processos celulares.

Adicionalmente, foram realizadas análises de enriquecimentos de vias utilizando os dados de expressão diferencial. Nesta etapa foi observado que as vias do ciclo celular, tradução de RNAs e mecanismos de transporte, foram as mais enriquecidas (WOLF, 2019). Além disso, foi observado que linhagens menos tolerantes ao etanol crescem mais rápido e também morrem menos do que as mais tolerantes (ALMEIDA, 2017). Portanto, está claro

que o efeito tóxico do etanol é extremamente complexo, afetando uma variedade enorme de processos celulares tornando difícil o estudo desses mecanismos e o desenvolvimento de leveduras mais tolerantes.

O crescimento celular foi associado com o estresse causado pelo etanol em outros trabalhos. De fato, genes como BUB1 (YGR188C), CDH1 (YGL003C), CLN3 (YAL040C), SWE1 (YJL187C), GRR1 (YJR090C), SWI4 (YER111C) e SWI6 (YRL182W), os quais estão presentes na via que controla o ciclo celular em *S. cerevisiae*, já foram descritos na literatura como genes importantes para o crescimento celular na presença de etanol na concentração de 11% v/v (KUBOTA et al., 2004). Esta informação nos indica que a célula controla a frequência em que se multiplica para contornar o estresse a qual está submetida, logo, estudar a fundo essa via é essencial para desenvolver maneiras de fazer a célula permanecer viável e se multiplicar mesmo na presença do estresse.

O ciclo celular foi escolhido como objeto de estudo deste trabalho dado a descoberta da sua importância no mecanismo de resposta ao etanol e ao fato de haver quatro lncRNAs que interagem com proteínas dessa via nas linhagens SEY6210 e BY4742 (MARQUES, 2019).

1.3. Ciclo celular em *Saccharomyces cerevisiae*

O ciclo celular é o conjunto de fases na qual uma célula deve passar para se multiplicar. Para ocorrer a divisão, a célula cresce continuamente em massa mesmo quando o ciclo celular já foi iniciado. Alguns eventos do ciclo ocorrem apenas uma vez na vida da célula, tais como a replicação do genoma (fase S), a mitose e a divisão celular. Tais eventos acontecem dentro de quatro fases: G1 (*gap1*), S (*synthesis*), G2 (*gap2*) e M (*mitosis*). As fase G1 é responsável por preparar a célula para a síntese de DNA (fase S) e a fase G2 prepara a célula para a mitose (fase M) e divisão celular (ALBERGHINA et al., 2012).

5. Conclusões

O modelo desenvolvido nesta dissertação possui o maior número de proteínas modeladas para o ciclo celular além de ser o primeiro modelo que contempla lncRNAs nesse processo. É também a primeira utilização dos dados de expressão diferencial em modelagem para prever fenótipos e testar hipóteses. Portanto, o modelo desenvolvido inova ao trazer estes tipos de análise, além de contribuir com um aumento de complexidade ao adicionar mais proteínas na modelagem. Além disso, ele apresentou uma boa precisão e se mostrou livre de viés.

Como o modelo desenvolvido contém as expressões criadas de forma a representar com fidelidade o comportamento real do ciclo celular, ele pode ser utilizado por outros grupos de pesquisa para testar outras hipóteses, desde que se adequem às limitações do modelo.

De forma geral, as simulações dos fenótipos HT e LT sugerem que as LTs retomam o crescimento após o tratamento com etanol de forma mais rápida por estarem mais preparadas para realizar a citocinese em relação às HTs, as quais estão paradas antes mesmo do *START* ocorrer. Foi possível observar também que o alto dano ao DNA após o tratamento com etanol pode estar relacionado com a inibição das duas ramificações do *checkpoint* responsável pelo reparo, e que a manutenção de pelo menos uma dessas ramificações pode ser suficiente para a célula ser capaz de cessar o ciclo e realizar o reparo.

Os lncRNAs demonstram um potencial de serem importantes para o ciclo celular quando tratados como inibidores de seus alvos. De fato, um lncRNA da linhagem SEY6210 é capaz de livrar esta linhagem do *arrest* típico do fenótipo. No entanto, para a outra linhagem, nenhuma simulação envolvendo os lncRNAs foi capaz de contornar o fenótipo característico de HT. Porém, testando isoladamente os efeitos do dano ao DNA, um lncRNA presente na linhagem BY4742 demonstrou ser capaz de contornar no *arrest* característico desse fenótipo permitindo que a célula se divida mesmo com o DNA danificado; isso poderia explicar a alta porcentagem de células que acumulam dano ao DNA nessa linhagem. Embora, nesse caso, os lncRNAs como inibidores tenham agido de forma a favorecer a completude do ciclo celular, a simulação de outros dois lncRNAs que interagem com o complexo ORC demonstrou que a inibição desse complexo pode causar um *arrest* em G1. De forma geral, lncRNAs agindo como inibidores aparentam possuir muita importância no controle do ciclo celular.

As análises de *docking* molecular foram realizadas utilizando *softwares* que não foram desenvolvidos para tratar de lncRNAs, porém, ainda foi possível extrair informações

valiosas. Devido ao tamanho do lncRNA, as proteínas conseguiram se ligar a mais de uma região da molécula. Além disso, a ligação ocorria preferencialmente nas regiões de dupla fita do lncRNA, comportamento que foi encontrado na análise pelo *software* DRNAPred. Esse *software* indicou que ambas as proteínas só conseguem se ligar em duplas fitas e, de fato, os resíduos com maior probabilidade de se ligar a DNA eram os mais próximos do lncRNA no *docking*.

Embora o modelo tenha apresentado bons resultados, vale ressaltar as suas limitações. Por ser do tipo lógico, o modelo não é capaz de prever situações dependentes do tempo, tais como mutações que levam a uma diferença na massa final da levedura devido ao ciclo ter ocorrido mais rápido ou mais devagar que o normal. Também, o fenômeno biológico da reduplicação do DNA é extremamente difícil de ser modelado de maneira qualitativa por depender da variação da concentração de proteínas específicas em tempo real. Outro ponto negativo é a modelagem da intensidade em que algumas proteínas interagem. Por exemplo, a “C1b1/2”, a qual possui mais de um inibidor da proteína e cada um deles possui intensidades de inibição diferentes. Nesse caso, as expressões criadas foram capazes de serem capazes de modelar corretamente o processo, embora sejam extremamente difíceis de serem criadas e confusas de se trabalhar além de serem muito extensas (Arquivo Suplementar 1).

A modelagem de sistemas biológicos se mostrou uma ferramenta importante para o estudo de dados provenientes de técnicas *high-throughput*. Com essa abordagem, é possível criar novas hipóteses e testar as já existentes de uma maneira sistêmica, evitando o gasto desnecessário de tempo e recursos. No entanto, a modelagem de sistemas biológicos, ainda está em um estágio inicial, e possui várias limitações no desenvolvimento de modelos mais complexos. Embora seja possível extrair informações valiosas de um modelo matemático, ele não é o suficiente para provar hipóteses. O futuro da modelagem de sistemas biológicos depende da aliança entre previsões computacionais seguidas de testes em laboratório.

6. Referências

- ALBERGHINA, Lilia et al. Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein-protein interaction network. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 52–72, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.010>>.
- ALCASABAS, Annette A. et al. Control analysis of the eukaryotic cell cycle using gene copy-number series in yeast tetraploids. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.
- ALMEIDA, L. F. de. **Análise das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao estresse por etanol**. 2017. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, 2017. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/152537>>.
- ASANO, Satoshi et al. Direct phosphorylation and activation of a Nim1-related kinase Gin4 by Elm1 in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27090–27098, 2006.
- BARBERIS, Matteo et al. Cell size at S phase initiation: An emergent property of the G 1/S network. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 649–666, 2007.
- BARNUM, Kevin J; O’CONNELL, Matthew J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods Mol Biol**, v. 1170, n. 10, p. 29–40, 2014.
- BARRAL, Yves et al. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. **Genes & development**, v. 13, n. 2, p. 176–187, 1999.
- BLOOM, Joanna; CROSS, Frederick R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 149–160, 2007.
- BLYTHE, Amanda J.; FOX, Archa H.; BOND, Charles S. The ins and outs of lncRNA structure: how, why and what comes next?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 46–58, 2016.
- BREWER, B J; CHLEBOWICZ-SLEDZIEWSKA, E; FANGMAN, W L. Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 11, p. 2529–2531, 1984.
- CHANDLER, M et al. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 427–454, 2004.
- CHANG, Ya Lan et al. Yeast Cip1 is activated by environmental stress to inhibit Cdk1-G1 cyclins via Mcm1 and Msn. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00080-y>>.
- CHEN, Katherine C. et al. Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 8, p. 3841–3862, 2004.

- CHEN, Yinhuai; SANCHEZ, Yolanda. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA repair*, v. 3, n. 8-9, p. 1025-1032, 2004.
- CONNELLY, Carla; HIETER, Philip. Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell*, v. 86, n. 2, p. 275-285, 1996.
- COSTANZO, Michael et al. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, v. 117, n. 7, p. 899–913, 2004.
- CVRCKOVÁ, F.; NASMYTH, K. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *The EMBO Journal*, v. 12, n. 13, p. 5277–5286, 1993.
- CROSS, Frederick R. Two redundant oscillatory mechanisms in the yeast cell cycle. *Developmental cell*, v. 4, n. 5, p. 741-752, 2003.
- DE BRUIN, Robertus A.M. et al. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, v. 117, n. 7, p. 887–898, 2004.
- DE JONG, Hidde. Modeling and Simulation of Genetic Regulatory Systems: A Literature Review. *Journal of Computational Biology*, v. 9, n. 1, p. 67–103, 2002. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/10665270252833208>>.
- DESANY, B. A. et al. Regulation of RAD53 by the ATM-Like Kinases MEC1 and TEL1 in Yeast Cell Cycle Checkpoint Pathways. *Science*, v. 271, n. 5247, p. 357–360, 2006.
- DUSZCZYK, Malgorzata M. et al. The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. *Rna*, v. 17, n. 11, p. 1973-1982, 2011.
- EPSTEIN, Charles B; CROSS, Frederick R. CLB5: A novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes and Development*, v. 6, n. 9, p. 1695–1706, 1992.
- FAURÉ, Adrien et al. Modular logical modelling of the budding yeast cell cycle. *Molecular BioSystems*, v. 5, n. 12, p. 1787–1796, 2009.
- FELDMAN, R M Renny et al. A Complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/Cullin Catalyzes Ubiquitination of the Phosphorylated CDK Inhibitor Sic1p* physiological ubiquitination reactions require E3s, and whether all E3s will participate directly in both substrate. *Cell*, v. 91, p. 221–230, 1997. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0092867400804043/1-s2.0-S0092867400804043-main.pdf?_tid=594f3dae-5f52-496e-b92c-c04f4f123ad4&acdnat=1528357318_a48d51ddcbc971006770f8c6d0bc9039>.
- FERRÈ, Fabrizio; COLANTONI, Alessio; HELMER-CITTERICH, Manuela. Revealing protein-lncRNA interaction. *Briefings in Bioinformatics*, v. 17, n. 1, p. 106–116, 2016.

- FORSBURG, S. Cell Cycle Regulation In The Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* And *Schizosaccharomyces-Pombe*. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 227–256, 1991.
- FOSS, Margit et al. Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. **Science**, v. 262, n. 5141, p. 1838-1844, 1993.
- FUTCHER, Bruce. Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1635–1646, 1996.
- GAURAV, N. et al. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, n. September 2016, p. 205–214, 2017.
- GHADIRYANFAR, Mohsen et al. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 473–481, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.022>>.
- GIAEVER, Guri et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *nature*, v. 418, n. 6896, p. 387-391, 2002.
- GOH, Phuay-Yee; SURANA, Uttam. Cdc4, a Protein Required for the Onset of S Phase, Serves an Essential Function during G 2 /M Transition in *Saccharomyces cerevisiae* . **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 8, p. 5512–5522, 1999.
- GUPTA, Anubhuti; VERMA, Jay Prakash. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>>.
- HOPFENSITZ, Martin et al. Attractors in Boolean networks: A tutorial. **Computational Statistics**, v. 28, n. 1, p. 19–36, 2013.
- HU, Fenghua et al. Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. **Cell**, v. 107, n. 5, p. 655–665, 2001.
- HU, X. H. et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1479–1487, 2007.
- HUNG, Tiffany et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. **Nature genetics**, v. 43, n. 7, p. 621, 2011.
- INGALLS, Brian P. Mathematical modeling in systems biology: an introduction. **MIT press**, 2013.
- IRONS, D. J. Logical analysis of the budding yeast cell cycle. **Journal of Theoretical Biology**, v. 257, n. 4, p. 543–559, 2009.

- JEOUNG, Doo-Il; OEHLEN, L. J. W. M.; CROSS, Frederick R. Cln3-Associated Kinase Activity in *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by the Mating Factor Pathway . **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 1, p. 433–441, 1998.
- JIMÉNEZ, Javier et al. The role of MEN (mitosis exit network) proteins in the cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2005.
- KALDIS, Philipp; SUTTON, Ann; SOLOMON, Mark J. The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. **Cell**, v. 86, n. 4, p. 553–564, 1996.
- KITAGAWA, Masatoshi et al. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 24, p. 4785–4794, 2013.
- KUBOTA, Shunsuke et al. Effect of Ethanol on Cell Growth of Budding Yeast: Genes That Are Important for Cell Growth in the Presence of Ethanol. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 968–972, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.68.968>>.
- KRAIKIVSKI, Pavel et al. From START to FINISH: computational analysis of cell cycle control in budding yeast. **NPJ systems biology and applications**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2015.
- KUNG, Johnny T.Y.; COLOGNORI, David; LEE, Jeannie T. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 651–669, 2013.
- LABORATORIES, Kanehisa. **Cell Cycle - Yeast - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)**. Disponível em: <[https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=sce04111&keyword=cell cycle](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=sce04111&keyword=cell%20cycle)>. Acesso em: 9 ago. 2019.
- LE NOVERE, Nicolas. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 3, p. 146–158, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3885>>.
- LEE, Sarah E. et al. Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. **Current Biology**, v. 11, n. 10, p. 784–788, 2001.
- LI, Fangting et al. The yeast cell cycle is robustly designed. v. 2004, p. 1–6, 2004. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/B1097137-BA46-4A56-B6ED-65D450BCD547>>.
- LI, Zhijin et al. The Role of Long Noncoding RNAs in Gene Expression Regulation. In: **Gene Expression Profiling in Cancer**. IntechOpen, 2019.
- LIU, Yongchao et al. lncRNA GAS5 enhances G1 cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer. **Scientific reports**, v. 5, p. 10159, 2015.
- LONGHESE, Maria Pia et al. DNA damage checkpoint in budding yeast. **EMBO Journal**, v. 17, n. 19, p. 5525–5528, 1998.

LU, Lu et al. Epigenetic silencing of miR-218 by the lncRNA CCAT1, acting via BMI1, promotes an altered cell cycle transition in the malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 304, p. 30-41, 2016.

MERCER, Tim R.; DINGER, Marcel E.; MATTICK, John S. Long non-coding RNAs: Insights into functions. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 3, p. 155–159, 2009.

MARQUES, L. F. **Busca e análise de lncRNAs (long non-coding RNAs) importantes para a tolerância ao etanol em *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

MARÍN-BÉJAR, Oskar et al. The human lncRNA LINC-PINT inhibits tumor cell invasion through a highly conserved sequence element. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 202, 2017.

MELO, Justine; TOCZYSKI, David. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current opinion in cell biology*, v. 14, n. 2, p. 237-245, 2002.

MICHAELIS, Christine; CIOSK, Rafal; NASMYTH, Kim. Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. **Cell**, v. 91, n. 1, p. 35–45, 1997.

MIMURA, Satoru et al. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. **Nature**, v. 431, n. 7012, p. 1118–1123, 2004.

MOHD AZHAR, Siti Hajar et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, n. February, p. 52–61, 2017.

MORAVCEVIC, Katarina et al. Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 966-977, 2010.

NADAL-RIBELLES, Mariona et al. Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA Mariona. v. 40, n. 6, p. 1301–1315, 2012.

NEECKE, Holger; LUCCHINI, Giovanna; LONGHESE, Maria Pia. Cell cycle progression in the presence of irreparable DNA damage is controlled by a Mec1- and Rad53-dependent checkpoint in budding yeast. **EMBO Journal**, v. 18, n. 16, p. 4485–4497, 1999.

NELSON, David L; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [S.l.]: artmed, 2014.

NGUYEN, Van Q.; CO, Carl; LI, Joachim J. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. **Nature**, v. 411, n. 6841, p. 1068–1073, 2001.

NIPHADKAR, Shreyas; BAGADE, Praful; AHMED, Shadab. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. **Biofuels**, v. 9, n. 2, p. 229–238, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>>.

- NOBLE, D. The future: putting Humpty-Dumpty together again. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 1, p. 156–158, 2003.
- NOUGAREDE, R. et al. Hierarchy of S-Phase-Promoting Factors: Yeast Dbf4-Cdc7 Kinase Requires Prior S-Phase Cyclin-Dependent Kinase Activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 11, p. 3795–3806, 2000.
- PFLEGER, Cathie M.; KIRSCHNER, Marc W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. **Genes & development**, v. 14, n. 6, p. 655-665, 2000.
- PRAMILA, Tata et al. Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle. **Genes and Development**, v. 16, n. 23, p. 3034–3045, 2002.
- RASS-HANSEN, Jeppe et al. Perspective Bioethanol: fuel or feedstock. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. October 2006, p. 329–333, 2007.
- ROCK, Jeremy M.; AMON, Angelika. The FEAR network. **Current Biology**, v. 19, n. 23, p. 1–10, 2009.
- RUBINSTEIN, Amir et al. The effective application of a discrete transition model to explore cell-cycle regulation in yeast. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, 2013.
- RUDNER, Adam D.; MURRAY, Andrew W. The spindle assembly checkpoint. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 773–780, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>>.
- RUPE, Ivan. Checking cell size in yeast. v. 18, n. 9, p. 1–7, 2002. Disponível em: <<papers2://publication/uuid/A372A6F4-A3CE-4178-8589-B39EFD800165>>.
- SAHIN, Özgür et al. Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 1–20, 2009.
- SALLES-FILHO, Sergio Luiz Monteiro et al. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector: The innovation driver. **Energy Policy**, v. 108, n. May, p. 70–77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2017.05.037>>.
- SANTOS, Alberto; WERNERSSON, Rasmus; JENSEN, Lars Juhl. Cyclebase 3.0: A multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1140–D1144, 2015.
- SHEU, Yi Jun; STILLMAN, Bruce. The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. **Nature**, v. 463, n. 7277, p. 113–117, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08647>>.

- SHOU, Wenying; DESHAIES, Raymond J. Multiple telophase arrest bypassed (tab) mutants alleviate the essential requirement for Cdc15 in exit from mitosis in *S. cerevisiae*. **BMC Genetics**, v. 3, p. 1–12, 2002.
- SOLÉ, Carme et al. A novel role for lncRNAs in cell cycle control during stress adaptation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 299–308, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00294-014-0453-y>>.
- SRIVASTAVA, Neha et al. A review on fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. **International Journal of Green Energy**, v. 12, n. 9, p. 949–960, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15435075.2014.890104>>.
- STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010.
- STEMMANN, Olaf; LECHNER, J. The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore contains a cyclin-CDK complexing homologue, as identified by in vitro reconstitution. **The EMBO journal**, v. 15, n. 14, p. 3611-3620, 1996.
- STRAIGHT, Aaron F. Cell cycle: checkpoint proteins and kinetochores. **Current biology**, v. 7, n. 10, p. R613-R616, 1997.
- SUN, Shuyan. Meta-analysis of Cohen's kappa. **Health Services and Outcomes Research Methodology**, v. 11, n. 3-4, p. 145-163, 2011.
- TANAKA, Seiji; DIFFLEY, John F X. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 3, p. 198–207, 2002.
- TAKEHARA, Masaya et al. Analysis of mutant origin recognition complex with reduced ATPase activity in vivo and in vitro. **Biochemical Journal**, v. 413, n. 3, p. 535-543, 2008.
- TEIXEIRA, Miguel C. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5761–5772, 2009.
- TODD, Robert G.; HELIKAR, Tomáš. Ergodic Sets as Cell Phenotype of Budding Yeast Cell Cycle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- TOMLIN, Claire J.; AXELROD, Jeffrey D. Biology by numbers: Mathematical modelling in developmental biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 331–340, 2007.
- TRACY, Kirsten M. et al. Mitotically-associated lncRNA (MANCR) affects genomic stability and cell division in aggressive breast cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 16, n. 4, p. 587-598, 2018.

TRIPATHI, Vidisha et al. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. **PLoS genetics**, v. 9, n. 3, 2013.

VERMA, R et al. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk Required for Its Degradation and Entry into S Phase. **Science**, v. 278, n. 5337, p. 455–460, 1997.

WANG, Rui Sheng; SAADATPOUR, Assieh; ALBERT, Réka. Boolean modeling in systems biology: An overview of methodology and applications. **Physical Biology**, v. 9, n. 5, 2012.

WANG, Yanchang; HU, Fenghua; ELLEDGE, Stephen J. The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. **Current Biology**, v. 10, n. 21, p. 1379–1382, 2000.

WANG, Kevin C.; CHANG, Howard Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 904-914, 2011.

WÄSCH, Ralph; CROSS, Frederick R. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 556-562, 2002.

WEINERT, Ted A.; KISER, Gretchen L.; HARTWELL, L. H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. **Genes and Development**, v. 8, n. 6, p. 652–665, 1994.

WEI, Yanping et al. LncRNA UCA1-miR-507-FOXM1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma. **Medical Oncology**, v. 33, n. 8, p. 88, 2016.

WOLF, I. R. **Identificação de assinaturas sistêmicas associadas à tolerância ao etanol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

YAMASHITA, Akira; SHICHINO, Yuichi; YAMAMOTO, Masayuki. The long non-coding RNA world in yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 147–154, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.003>>.

YANG, Hui; REN, Qun; ZHANG, Zhaojie. Cleavage of Mcd1 by Caspase-like Protease Esp1 Promotes Apoptosis in Budding Yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 1, p. 308–317, 2008.

ZHU, Juan Juan et al. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 10, p. 876–885, 2013.