

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA

MOLECULAR



**Estudo de expressão de genes para transportadores do tipo
ABC em *Crinipellis pernicioso* e análise de bioinformática do
gene *SOD2* de *Crinipellis pernicioso***

DORIVAL DE FREITAS FILHO

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

Julho de 2005

DORIVAL DE FREITAS FILHO

Estudo de expressão de genes para transportadores do tipo ABC em *Crinipellis pernicios* e análise de bioinformática do gene *SOD2* de *Crinipellis pernicios*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS - BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

DORIVAL DE FREITAS FILHO

Estudo de expressão de genes para transportadores do tipo ABC em *Crinipellis pernicioso* e análise de bioinformática do gene *SOD2* de *Crinipellis pernicioso*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Aprovada: 27 de julho de 2005

Prof. Dr. João Antonio Pegas Henriques
UFRGS

Dr. Martin Brendel
UESC

Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo
UESC - Orientador

A minha família que, com o amor a mim dedicado, tornou a conclusão desse mestrado possível,

Dedico

A Sônia, pela imensa importância que sua presença teve para mim durante todo o mestrado. Pelo seu carinho e sua paciência inabalável,

Ofereço

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Júlio Cascardo, a quem admiro pelo prazer e seriedade com que executa o seu trabalho.

À Professora Dra. Cristina Pungartinik, que chegou a Ilhéus no exato momento em que eu iniciei meus trabalhos práticos, agradeço por todos os inestimáveis ensinamentos e pela amizade.

Ao Professor Dr. Abelmon e a Professora Dra. Fabienne por estarem sempre se antecipando as minhas necessidades com suas orientações.

A Stênio e Maysa pela generosidade e paciência que sempre tiveram comigo.

Aos meus colegas do laboratório de Genética Molecular, em especial a Joci, que sempre se mostrou solícita, além de dedicar parte do seu tempo para gerenciar o laboratório.

Aos meus colegas do laboratório de Monitoramento Ambiental, em especial a Tatiana, pela ajuda e companhia, sem a qual o meu trabalho teria se tornado mais difícil.

Aos meus colegas de mestrado pela amizade, companheirismo e solidariedade que sempre estiveram presentes no nosso convívio.

À Alayne e sua família, que por duas vezes me recebeu em sua cidade, me proporcionando momentos importantes de relaxamento e de agradabilíssimo convívio.

A todos os professores que com suas aulas, ou fora delas, contribuíram para a minha formação nesse mestrado.

Aos funcionários da UESC que fazem um trabalho muitas vezes silencioso, mas sem o qual todo o resto seria inviável.

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Theobroma cacao</i>	3
2.2. <i>Crinipellis perniciosa</i>	4
2.3. Estratégias de resistência.....	5
2.4. Transportadores do tipo ABC.....	6
2.5. Transportadores do tipo ABC e defesa de plantas.....	11
2.6. Expressão de genes que codificam para transportadores do tipo ABC.....	13
2.7. Paraquat e 4-nitroquinoleína (4NQO).....	14
2.8. Superóxido dismutase (SOD).....	17
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. Condições de crescimento do fungo.....	20
3.2. Exposição a agentes mutagênicos e sobrevivência.....	21
3.3. Análises de bioinformática.....	22
3.4. Primers e RT-PCR.....	23
3.5. Extração de RNA total de <i>C. perniciosa</i>	24
3.6. Obtenção do cDNA.....	25
3.7. Normalização com base na amplificação com o <i>primer</i> da actina.....	25
3.8. PCR para quantificação da expressão do gene para transportador do tipo ABC.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Determinação de método para análises quantitativas em <i>C. perniciosa</i>	27
4.2. Sensibilidade aos agentes mutagênicos.....	29
4.3. Motivos Walker A e Walker B e seqüência de assinatura de genes para transportadores do tipo ABC.....	31
4.4. Análise do gene <i>SOD2</i>	33
4.5. Desenho e teste de <i>primers</i> para seqüência homóloga a genes para transportadores do tipo ABC.....	36

4.6. Análise da expressão gênica.....	39
5. DISCUSSÃO	42
5.1. Desenvolvimento de um método para análises quantitativas de doses de agentes químicos em <i>C. perniciososa</i>	42
5.2. Sensibilidade aos agentes PAQ, 4NQO, H ₂ O ₂ e UVC	43
5.3. Motivos Walker A e Walker B e seqüência de assinatura.	44
5.4. Análise do gene <i>SOD2</i>	44
5.5. Desenho dos <i>primers</i>	45
5.6. RT-PCR	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

EXTRATO

Filho, Dorival de Freitas, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Julho de 2005. **Estudo de expressão de genes para transportadores do tipo ABC em *Crinipellis pernicioso* e análise de bioinformática do gene *SOD2* de *Crinipellis pernicioso*.**

Orientador: Prof. Dr. Júlio C. M. Cascardo. Co-orientadores: Dra. Cristina Pungartinik e Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli.

O fungo *Crinipellis pernicioso* é a principal doença do cacaueteiro no sul da Bahia. Sua introdução nessa região, em 1989, causou imensos prejuízos financeiros e sociais a toda a comunidade sul-baiana. Além de se mostrar bastante resistente às defesas naturais do cacaueteiro, a utilização de fungicidas como forma de controle químico do *C. pernicioso* não tem dado resultados satisfatórios. Para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos de defesa do *C. pernicioso*, nesse trabalho foram estudados dois genes que estão envolvidos com resistência em vários organismos. A partir de informações obtidas no banco de dados do Projeto Genoma do *C. pernicioso*, foram selecionadas duas seqüências de DNA para estudo: uma homóloga a genes para superóxido dismutases (SOD) e outra seqüência parcial homóloga a genes que codificam para transportadores do tipo ABC (ATP Binding Cassette). Os genes *SOD* estão envolvidos na célula com a proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo. Muitas plantas tentam se defender de parasitas submetendo-os a um estresse oxidativo. Além disso, o mecanismo de ação de muitos defensivos agrícolas está fundamentado na geração de estresse oxidativo. O presente trabalho mostrou que o *C. pernicioso* possui um gene *SOD* que codifica uma proteína que apresenta um sítio de ligação a Mn e Fe. Essa proteína possui um peptídeo sinal que a direciona a mitocôndria. Os dados de homologia com genes *SOD* de outros organismos, a presença do metal Mn e a localização na mitocôndria sugerem que trata-se de um gene da subfamília *SOD2*. Estudos posteriores analisarão se a presença desse gene confere maior resistência ao estresse oxidativo ao *C. pernicioso*. Transportadores do tipo ABC são responsáveis por efluxo de substâncias tóxicas em vários organismos, tornando-os mais resistentes. Entre as várias substâncias que os transportadores do tipo ABC bombeiam para o meio extracelular, estão compostos de defesa produzidos pelas próprias plantas e agentes químicos utilizados como defensivos agrícolas.

No presente trabalho foi analisado se a presença dos agentes paraquat e óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) aumentariam a expressão de um gene para transportador do tipo ABC em *C. pernicioso*. Os resultados do RT-PCR mostraram que, nas condições do experimento, não houve aumento perceptível na expressão do gene. Novos experimentos estão em andamento de forma a confirmar esse padrão de expressão, ou não.

Palavras-chave: *Crinipellis pernicioso*, transportadores do tipo ABC, SOD, óxido de 4-nitroquinoleína, paraquat.

ABSTRACT

Filho, Dorival de Freitas, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, July, 2005.
***Crinipellis pernicioso* ABC transporters gene expression studies and *in silico* analysis of the *Crinipellis pernicioso* SOD2 gene.** Advisor: Prof. Dr. Júlio C. M. Cascardo. Co-advisors: Dr. Cristina Pungartinik e Dr. Fabienne Florence Lucienne Micheli

The fungus *Crinipellis pernicioso* is the main disease found in the cacao crop in Bahia. Its introduction in Bahia caused several economic and social losses to all south-east community of Bahia. Besides being resistant to most of the cacao natural defences, the use of fungicides as a chemical control strategy has no satisfactory results. For a better comprehension about the *C. pernicioso* defence mechanisms, we have carried out studies with two genes involved with resistance for several organisms. Using the data from the *C. pernicioso* genome project, two DNA sequences were selected: one coding for a homologous super oxide dismutase gene (SOD) and another partial coding region for ABC transporters type genes (ATP Binding Cassete). The SOD genes are involved, within the cell, with protection against damages caused by oxidative stresses. Several plants use oxidative stress as a defense mechanism. In addition, the mechanism of action of most agricultural pesticides is based on oxidative stress. The current work showed that *C. pernicioso* contains a SOD gene that encodes for a protein with a binding domain for Mn and Fe. This protein contains a signal peptide for mitochondrial addressing. The homology with other SOD genes from other organisms, the presence of Mn and the mitochondrial localization, suggested that it is a gene belonging to the sub-family SOD2. Further studies will elucidate the role of this gene conferring resistance to oxidative stress in *C. pernicioso*. ABC type transporters are responsible for the efflux of toxic substances in a wide range of organisms, making them more resistant. Among the substances the ABC transporters pump out the cell, we found defense compounds produced by plants and chemical substances used and agricultural defensives. The present work tested if the presence of paraquat and 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) would increase the expression of the ABC gene in *C. pernicioso*. The results obtained so far, at the experimental conditions used, no increase detected. Further experiments are being carried on in order to confirm this expression pattern, or not.

Key words: *Crinipellis pernicioso*, ABC transporters, SOD, 4-nitroquinoline 1-oxide, paraquat.

1. INTRODUÇÃO

Muitos microorganismos isolados do solo e de ambientes associados a plantas produzem metabólitos secundários que podem ou não afetar negativamente o crescimento ou atividade metabólica de outros microorganismos. A pressão seletiva, quando negativa, favoreceu aqueles que desenvolveram mecanismos de tolerância a antibióticos exógenos e, também, permitiu a prevenção da auto-intoxicação causada pela própria produção desses antibióticos (SCHOONBEEK et al., 2002).

Uma das estratégias que confere resistência a esses compostos é o efluxo de substâncias para o meio extracelular. Entre os mecanismos ativos de efluxo conhecidos, um dos melhor caracterizados é aquele realizado pelos transportadores do tipo ABC (“ATP-binding cassette”). Os transportadores do tipo ABC estão presentes desde bactérias até humanos e são responsáveis pelo influxo e efluxo de várias substâncias. Eles formam uma grande família de proteínas que codificam enzimas que acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de diversos substratos como lipídios, ácidos inorgânicos, açúcares, aminoácidos, peptídeos e xenomoléculas usadas como drogas (SLAVEN et al., 2002).

As funções naturais de transportadores do tipo ABC em fungos patógenos de plantas incluem secreção de toxinas, que agem como fatores de virulência, e proteção contra compostos de defesa e fungicidas sintéticos.

Já foi constatado que muitos fungos, quando em presença de compostos de defesa ou fungicidas sintéticos, aumentam a expressão de genes que codificam para transportadores do tipo ABC, o que aumenta a sua resistência.

Uma vez que o projeto genoma do *C. pernicioso* revelou a presença de vários genes que, aparentemente, codificam esses transportadores, é importante verificar como eles se comportam quando o fungo está atacando o cacaueteiro ou se defendendo de fungicidas pois podem estar relacionados a resistência do fungo a várias formas atuais de controle.

O projeto genoma do *C. pernicioso* também revelou a presença de possíveis genes da família dos superóxidos dismutases (SOD). Esses genes estão envolvidos na proteção à célula a um tipo de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser resultado tanto da fisiologia da própria célula, uma vez que o processo da cadeia respiratória, gera radicais livres, como também pode ser fruto de estratégias de defesa de vegetais ao ataque de patógenos ou da presença de compostos sintéticos, como herbicidas ou fungicidas (LANDIS et al., 2005).

A compreensão da estrutura e função de proteínas produzidas por genes *SOD* em *C. pernicioso* pode acrescentar, portanto, informações importantes a respeito de estratégias de defesa do *C. pernicioso*, o que pode conduzir a novas ações de combate ao fungo.

Diante desse contexto, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Determinar uma metodologia adequada para estudos quantitativos em *C. pernicioso*.
2. Análise de bioinformática de:
 - a. Motivos presentes nos domínios transmembrana (TMD) de transportadores do tipo ABC.
 - b. Seqüências de DNA de *C. pernicioso* homólogas a genes para transportadores do tipo ABC.
 - c. Seqüências de DNA de *C. pernicioso* homólogas a genes *SOD*.
3. Analisar quantitativamente a expressão de genes para transportadores do tipo ABC em *C. pernicioso* em função da exposição do fungo aos compostos Paraquat e óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Theobroma cacao*

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta da família *Sterculiaceae*. Ele, provavelmente, é originado da Floresta Amazônica e é cultivado em várias partes do mundo com o objetivo de obtenção de suas sementes (amêndoas) que são matéria-prima para a fabricação de manteiga de cacau e chocolate (ALVES, 2002).

Introduzido no sul da Bahia em 1756, o produto só se firmou como cultivo a partir da segunda metade do século 19. Durante 70 anos, entre 1890 e 1960, o cacau foi o principal responsável pelo desenvolvimento e crescimento de todo o sul baiano. Na safra 1984/1985, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de amêndoas de cacau, produzindo aproximadamente 400.000 toneladas. Somente com os lucros e excedentes do produto, os "coronéis do cacau", o governo estadual e as prefeituras da região construíram aeroportos, escolas, hospitais, postos de saúde e portos em 92 cidades do Estado. Mas, em 2000, a produção total caiu para 210.000 toneladas.

Essa queda na produção pode ser, em parte, explicada pela introdução na lavoura cacauzeira do sul da Bahia do fungo agárico *Crinipellis pernicioso*, causador de uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa. Um levantamento realizado pela Comissão Executiva para o Planejamento da Lavoura Cacauzeira (CEPLAC) revela que, nos últimos anos, a vassoura-de-bruxa impediu que mais de 850 mil t de cacau fossem colhidas na Bahia, com um prejuízo de mais de US\$ 1,2 bilhão aos fazendeiros e à economia da região.

2.2. *Crinipellis pernicioso*

A provável origem do *C. pernicioso* é a bacia amazônica, onde ele ocorre de forma endêmica, sendo que sua introdução na Bahia foi confirmada em 1989 (PEREIRA et al., 1996). Ele é um patógeno hemibiotrófico no qual os basidiósporos são capazes de infectar tecidos meristemáticos de *T. cacao* e de várias outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (ambas pertencentes à família *Sterculiaceae*).

É importante observar que os patógenos de plantas mais comuns são os ascomicetos, os oomicetos e os heterobasidiomicetos. Fungos que formam cogumelos são raros como patógenos, sendo o mais conhecido o *Armillaria mellea*, que é um patógeno de raiz que ataca e mata diversas espécies de árvores por meio de rizomorfos subterrâneos (GRIFFITH et al., 2003). Nesse contexto, é bastante incomum o fato do *C. pernicioso* atacar e deformar os tecidos verdes de plantas hospedeiras saudáveis. Há vários fungos agáricos que podem formar infecções biotróficas de tecidos de raiz como ectomicorrizas, mas não há exemplos claros de comportamento similar com partes aéreas de plantas. Entretanto, diversas linhas de evidência sugerem que associações entre basidiomicetos e plantas lenhosas são mais difundidas do que se sabe até então (GRIFFITH et al., 2003).

Os sintomas característicos da vassoura-de-bruxa são o resultado da hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados e da perda da dominância apical, sendo que a progressão da doença pode levar à morte da “vassoura” e sua subsequente exploração pelo patógeno (WHEELER et al., 1985). Em tecidos vivos a quantidade de micélio do fungo é pequena e é restrita à região cortical, onde cresce intercelularmente (PENMAN et al., 2000).

Embora os sintomas aparentem ser resultantes de um desequilíbrio na regulação do crescimento da planta (pode haver, por exemplo, uma destruição das auxinas e liberação de citocininas), o mecanismo da produção desses sintomas ainda é desconhecido (ORCHAD et al., 1994). Também não está claro se a morte da “vassoura” é o resultado da produção de toxinas pelo fungo ou de uma acelerada senescência do hospedeiro (EVANS 1980). Recentemente, (CEITA, 2004) mostrou que essa morte do cacau, na realidade trata-se de uma morte celular programada (PCD) induzida pelo patógeno, e provavelmente desencadeada por uma proteína capaz de induzir morte celular (MACÊDO, 2004).

O fungo *C. pernicioso* é dispersado por basidiósporos que se espalham com mais eficiência embaixo do dossel úmido que caracteriza as plantações de cacau. Entretanto, o fato desses basidiósporos requererem uma alta umidade para manter sua viabilidade e de serem suscetíveis a radiação solar UV-B, torna bastante improvável que eles possam ser dispersados por mais que 60 km (FRIAS et al., 1991). Na verdade, as pessoas têm sido o mais importante vetor de transmissão da doença, mais provavelmente por transportarem frutos de cacau infectados mas que estejam assintomáticos.

O controle químico da doença no cacau não tem sido satisfatório (KRAUSS, 2001). Além de aspectos ambientais, como a dificuldade de aplicar fungicidas em árvores tropicais e a sua ineficiência em regiões de alta atividade pluviométrica, é provável que o próprio *C. pernicioso* possua mecanismos de defesa que aumentem a sua resistência a esses compostos.

2.3. Estratégias de resistência

Em ambientes naturais, os microorganismos estão expostos a uma grande variedade de compostos tóxicos produzidos por organismos competidores e por eles próprios (SCHOONBEEK et al., 2002). Portanto, a sobrevivência deles é favorecida pela capacidade de resistir a esses compostos.

Existem variados mecanismos de resistência a drogas. Entre eles, há o caso em que uma droga pode ser inativada antes de encontrar o seu alvo. Algumas bactérias, por exemplo, hidrolisam o antibiótico. Em outra situação, o alvo é que pode ser modificado, como no caso de bactérias resistentes ao antibiótico vancomicina (SAIER et al., 2001). Mas, o principal mecanismo de resistência a drogas é o efluxo de substâncias (BORGES et al., 2001).

Mecanismos de efluxo estão relacionados a sensibilidade diferencial de sítios alvos em diferentes organismos e a diferenças na concentração da toxina que está sobre este sítio alvo. A concentração da toxina é determinada por fatores como o transporte, a estocagem e o seu metabolismo. Uma importante descoberta feita nas últimas décadas é que microorganismos, inclusive os eucariotos, possuem sistemas de efluxo que podem transportar compostos tóxicos através da membrana plasmática ou de membranas de organelas celulares. A origem do

substrato pode ser endógena ou exógena. Nos dois casos, a concentração da substância dentro de uma organela ou do citoplasma pode ser reduzida, o que pode resultar na redução da concentração da toxina sobre o sítio alvo e, desse modo, em uma maior resistência do organismo (SORBO et al., 2000).

Essa resistência a múltiplas drogas gerada por efluxo de substâncias pode ser obtida por meio de transportadores secundários (comum em procariotos), que utilizam a energia de um gradiente de prótons H^+ para facilitar um mecanismo antiporte, ou por transportadores do tipo ABC (ATP binding cassette), que acoplam a energia liberada pela hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) ao transporte de um substrato (CHANG, 2003). Esse efluxo de substâncias realizado por transportadores do tipo ABC constitui a principal causa de resistência a múltiplas drogas (YAMAMOTO et al., 2005).

2.4. Transportadores do tipo ABC

Os transportadores do tipo ABC são caracterizados por uma classe especial de ATPase que, quase invariavelmente, está ligada a uma proteína transportadora, a qual ela acopla a energia liberada pela hidrólise do ATP. O domínio protéico encarregado da ligação e transporte do substrato é bastante variável, devido a diversidade de substratos que os transportadores do tipo ABC podem transportar. Isso é refletido nas suas várias funções fisiológicas. Eles podem ser responsáveis por importar nutrientes para a célula, protegê-la de uma grande variedade de compostos tóxicos, sinalizar a presença de agentes infectantes, regular o desenvolvimento em microorganismos e mamíferos e assegurar o correto funcionamento em humanos de tecidos tão variados como os do sistema digestório, fígado, pulmões, retina e sistema imune (HOLLAND et al., 1999).

Os transportadores do tipo ABC compreendem uma das maiores entre todas as famílias de proteínas parálogas. Na bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, quase 5% do genoma é composto por genes que codificam para transportadores do tipo ABC (HIGGINS, 2001). O projeto genoma do *Saccharomyces cerevisiae* já revelou a presença de 29 desses genes. Eles ocorrem em todos os reinos (ANGERMEYR et al., 1999), sendo que, em bactérias,

estão presentes transportadores do tipo ABC que importam e exportam substâncias e em eucariotos há apenas os que exportam, o que pode ser explicado por uma remota divergência evolutiva entre essas duas classes de transportadores (CHANG, 2003).

Os genes que codificam para transportadores do tipo ABC têm sido classificados em diversas subfamílias de acordo com a filogenia e padrões estruturais. Os nomes usados para definir as subfamílias são frequentemente históricos e relacionados à função da droga a que causam resistência, embora alguns membros, claramente, não estão envolvidos em transportes de drogas e podem, por exemplo, funcionar como um canal regulador. As três subfamílias de transportadores do tipo ABC melhor caracterizadas são: “pleiotropic drug resistance” (PDR), “multidrug resistance”(MDR) e a “multidrug resistance-associated protein” (MRP) (JASINSKI et al., 2003). Os transportadores do tipo ABC dessas subfamílias possuem de 1300 a 1600 resíduos de aminoácidos e sua massa molecular varia entre 140 e 170 kDa (SORBO et al., 2000).

Quase todos os transportadores do tipo ABC são compostos por dois domínios transmembrana (TMDs) e dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBDs) (CHANG, 2003). Em adição a essa fórmula básica (TMD-NBD)₂, os transportadores do tipo ABC podem ser montados de formas variadas, podendo haver TMD adicionais ou acréscimo de domínios regulatórios (HOLLAND et al., 1999). Na maioria dos procariotos, essas subunidades TMD e NBD são expressadas como proteínas separadas, sendo posteriormente unidas. Nesse caso, os genes que codificam essas subunidades, normalmente, estão situados em um mesmo operon ou, no mínimo, em operons vizinhos (QUENTIN et al., 1999). Já em eucariotos, todos os domínios são contínuos em um mesmo polipetídeo, apresentando-os na orientação TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, no caso da subfamília MDR, ou na orientação reversa NBD1-TMD1-NBD2-TMD2, no caso da subfamília PDR. Na subfamília MRP a orientação é a mesma da subfamília PDR, mas alguns MRPs possuem 5 α hélices na porção amino terminal (Figura 1) (JASINSKI et al., 2003).

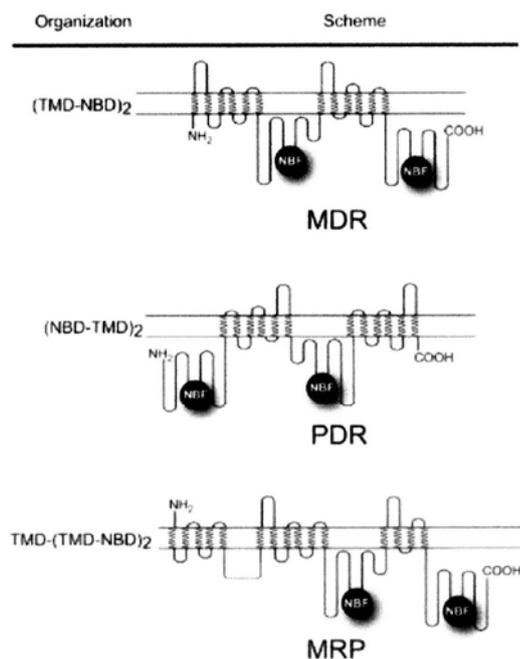


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de transportadores do tipo ABC das subfamílias MDR, PDR e MRP. Fonte: JASINSKI et al., 2003.

Os NBD são hidrofílicos e periféricamente associados à face citosólica da membrana. Eles são os responsáveis pela atividade ATPásica, que acopla a energia liberada pela hidrólise do ATP ao transporte. O fragmento consenso de todos NBDs possui, aproximadamente, 250 resíduos de aminoácidos e apresenta dois motivos, o Walker A e o Walker B (PEELMAN et al., 2003). Estudos mutacionais têm demonstrado que mudanças em aminoácidos nesses dois motivos não são toleradas no que se refere à atividade ATPásica (ANANTHARAMAN et al., 2001). Juntamente com esses dois motivos, os NBD também possuem a chamada seqüência de assinatura-ABC. Enquanto que os motivos Walker estão presentes em várias classe de proteínas que se ligam a ATP, a presença dessa região de assinatura é específica para transportadores do tipo ABC (Figura 2) (BODÓ et al., 2002).

NH2-terminus	Walker A	ABC signature	Walker B
MgAtr1	MLVLGRPGSGCSTFLK	VRGVSGGERKRVSI AETLASKSTVVCWDNSTRGLDA	
MgAtr2	LVVLGPPGSGCSTFLK	LRGVSGGERKRVITAEASLSGAALQAWDNSTRGLDS	
BcAtrA	LLVLGRPGSGCSTFLK	VRGVSGGERKRVSI AETLPTKKTVVSWDNSTRGLDA	
MgABC1	LVVLGPPGSGCSTFLK	IRGVSGGERKRVITAEAAALSGAPLQCDWNSTRGLDS	
AnAtrA	LLVLGRPGTGCSTFLK	VRGVSGGERKRVSI AEMALAMTPFAAWDNSSRGLDS	
AnAtrB	LLVLGRPGSGCTTLK	IRGVSGGERKRVSI IECLGTRASVFCWDNSTRGLDA	
PMR1	LIVLGRPGSGCSTFLK	IRGVSGGERKRVSI AEBATLCCSPLQCDWNSTRGLDS	
PDR5	LVVLGRPGSGCTTLK	VRGVSGGERKRVSI AEVSI CGSKFQCWDNSTRGLDS	
PDR10	LVVLGRPGAGCTTLK	VRGVSGGERKRVSI AEVSI CGSKFQCWDNSTRGLDS	
SNQ2	ILVLGRPGAGCSSFLK	VRGVSGGERKRVSI AEBALAAKGS IYQWDNSTRGLDA	
CDR1	TVVLGRPGAGCSTLLK	VRGVSGGERKRVSI AEBASLSGANIQCDWNSTRGLDS	
CDR2	TVVLGRPGAGCSTLLK	VRGVSGGERKRVSI AEBASLSGANIQCDWNSTRGLDS	
CDR3	TVVLGRPGAGCSTFLK	IRGISGGERKRLSI AEVTLVQASIQCDWNSTRGLDA	
BFR1	VMVLGQPGSGCSTFLR	VRGVSGGERKRVTI SBGFATRPTIACWDNSTRGLDS	
	*** ** *	** * * * * *	*** ** *
COOH-terminus	Walker A	ABC signature	Walker B
MgAtr1	VALMGASGAGKTTLLN	SSLGVEQRKRLTIGVELAAKPSLLLFLDEPTSGLDS	
MgAtr2	TALMGVSGAGKTTLLD	EGLNVEQRKRLTVGVELAAKPQLLLFLDEPTSGLDS	
BcAtrA	VALMGASGAGKTTLLN	RSLNVEQRKRVITIGVELAAKPNLLLFLDEATSGLDS	
MgABC1	TALMGVSGAGKTTLLD	EGLNVEQRKRLTIGVELAAKFPLLLFLVDEPTSGLDS	
AnAtrA	TALMGVSGAGKTTLLD	EGLNVEQRKLLTIGVELPPSPKLLLFLDEPTSGLDS	
AnAtrB	GALMGSSGAGKTTLLD	AGLSVEQRKRVITIGVELVSKPSILIFLDEPTSGLDG	
PMR1	TALMGVSGAGKTTLLD	EGLNVEQRKRLTIGVELAAKFPLLLFLDEPTSGLDS	
PDR5	TALMGASGAGKTTLLD	EGLNVEQRKRLTIGVELTAKPKLLVFLDEPTSGLDS	
PDR10	TALIGASGAGKTTLLD	EGLNVEQRKRLTIGVELAAKPKLLVFLDEPTSGLDS	
SNQ2	TALMGESGAGKTTLLN	CGLNVEQRKRLS IGVELVAKPDLLLFLDEPTSGLDS	
CDR1	TALMGASGAGKTTLLN	EGLNVEQRKRLTIGVELVAKPKLLVFLDEPTSGLDS	
CDR2	TALMGASGAGKTTLLN	EGLNVEQRKRLTIGVELVAKPKLLVFLDEPTSGLDS	
CDR3	TALMGASGAGKTTLLN	EGLNVEQRKRLTIAVELVARPKLLVFLDEPTSGLDS	
BFR1	TALMGESGAGKTTLLN	SGLNVEQRKRATIGVELAAKFPALLFLDEPTSGLDS	
	** * * * * * * * *	* * * * * * * * *	** * * * * * * *

Figura 2 – Alinhamento de motivos do domínio NBD de transportadores do tipo ABC em fungos. Fonte: BODÓ et al., 2003.

A presença de seis subdomínios em α -hélice caracteriza o “motif” Walker A enquanto que o “motif” Walker B possui cinco subdomínios em folha- β . Eles são ligados entre si por cerca de 100 resíduos de aminoácidos que, em sua maior parte, está enovelado em conformação α -hélice (*helical domain*) e que não tem equivalente em adenilatos quinases. A estrutura primária do “helical domain” é menos conservada e seu comprimento é consideravelmente variável quando comparado em proteínas diferentes. Unindo o “helical domain” ao Walker B, há um fragmento de peptídeo (*linker peptide*) bem conservado, rico em resíduos de glutamina e glicina. Há ainda uma região chamada “switch region” que foi reconhecida após comparação entre algumas proteínas (SCHNEIDER et al., 1998) (Figura 3).

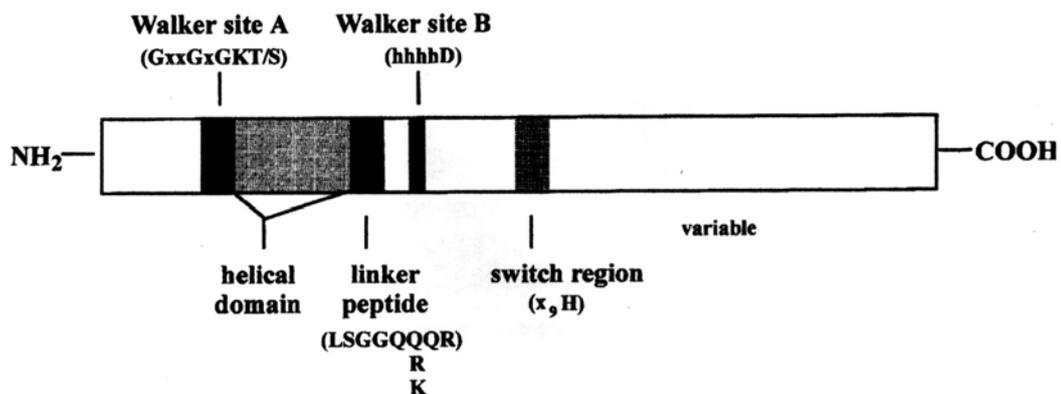


Figura 3 - Regiões conservadas de domínios NBD de transportadores do tipo ABC. Fonte: SCHNEIDER et al., 1998.

Enquanto que as subunidades NBD, como foi visto, são bastante conservadas, a arquitetura dos TMDs é bem mais variável, podendo possuir de 8 a 20 hélices transmembrana (LOCHER, 2004). A função dos TMDs é reconhecer e mediar a passagem de substâncias pela membrana (CHANG, 2003).

Embora, em geral, cada transportador do tipo ABC seja relativamente específico para um substrato em particular, é notável que existe um transportador do tipo ABC para cada tipo de molécula que deva atravessar a membrana. Transportadores do tipo ABC têm sido caracterizados com especificidade para pequenas e grandes moléculas, moléculas altamente carregadas e altamente hidrofóbicas. É especialmente importante haver um sistema para efluxo de moléculas hidrofóbicas, uma vez que, ao contrário das hidrofílicas, elas podem atravessar facilmente a membrana, sendo por isso que muitas armas químicas encontradas na natureza são hidrofóbicas (BORST et al., 2000). São conhecidos, ainda, sistemas com especificidade para íons orgânicos, açúcares, aminoácidos, proteínas e polissacarídeos complexos. Embora a maioria exiba uma alta especificidade a seu substrato, alguns são multiespecíficos, como os transportadores de oligopeptídeos que podem transportar todos os di e tripeptídeos e outros que possuem uma especificidade bastante ampla para moléculas hidrofóbicas (HIGGINS, 2001).

Uma possível explicação para essa imensa diversidade de substratos que pode ser transportada é a presença nos TMDs de uma grande câmara anfipática que deve conter sítios de ligação para muitos substratos. Esses substratos devem estabelecer interações de Van der Waals com os resíduos hidrofóbicos que estão

ao redor. O espaço dessa câmara é grande o suficiente para acomodar diferentes substratos interagindo com diferentes resíduos. A importância dessa hipótese é que ela fornece uma explicação simples para a existência de substratos de variados aspectos estruturais para transportadores do tipo ABC (JASINSKI et al., 2003).

Por causa da grande variedade de substratos transportados pelos transportadores do tipo ABC, os TMDs são pouco conservados no nível de sua estrutura primária e espera-se que também sejam muito diferentes no seu aspecto tridimensional (JASINSKI et al., 2003).

É, portanto, a grande conservação dos NBDs que define e delimita a família dos transportadores do tipo ABC. É importante frisar que é sua conservação como um todo que caracteriza a família, uma vez que outras proteínas que se ligam ao ATP também podem possuir os motivos Walker A e Walker B (HIGGINS, 2001).

Estudos evolutivos demonstram que a taxa de divergência das seqüências gênicas diferem drasticamente. Enquanto que as seqüências codificadoras para os TMD divergiram rapidamente, as seqüências que codificam os NBDs divergiram bem mais lentamente. Portanto, todos os NBDs são homólogos, mas isso não pode ser afirmado para os TMDs (SAIER et al., 2001). Desse modo, os transportadores do tipo ABC são proteínas que apresentam um “motor” comum (os NBDs), unido a especializados translocadores (TMDs).

2.5. Transportadores do tipo ABC e defesa de plantas

Como já visto, os transportadores do tipo ABC podem conferir resistência a várias drogas usadas na agricultura ou no tratamento de doenças em humanos, como os quimioterápicos. Mas não foi uma pressão seletiva causada por ações antrópicas que dirigiu a evolução dos transportadores do tipo ABC. O próprio ambiente natural já fornece essa pressão uma vez que possui uma vasta relação de substâncias tóxicas. Uma consequência disso, é que a quantidade de transportadores do tipo ABC varia muito entre organismos de espécies diferentes. Organismos como a *Escherichia coli*, a qual vive em diversos ambientes e necessita se adaptar a uma grande variedade de condições externas, tem por volta de 70 transportadores do tipo ABC codificados no seu cromossomo. Por

outro lado, outras espécies possuem muito pouco desses transportadores, talvez refletindo os seus estilos de vida restritos (HIGGINS, 2001).

Participando dessa “guerra química” que existe na natureza, plantas possuem múltiplos mecanismos de defesa na luta contra patógenos. Algumas dessas defesas envolvem barreiras químicas e físicas pré-formadas que tentam impedir a entrada do agente patogênico. Outras linhas de defesa são estimuladas em resposta a um ataque do patógeno e buscam limitar o seu posterior crescimento (CAMPBELL et al., 2003).

Algumas pesquisas sugerem que os transportadores envolvidos na proteção contra compostos de defesa de plantas são predominantemente transportadores do tipo ABC. Isso pode ser devido a imensa variedade de substratos que os transportadores do tipo ABC podem transportar em comparação a outros transportadores. Também pode indicar que os transportadores do tipo ABC estão primariamente envolvidos na proteção contra compostos tóxicos exógenos, enquanto que outros transportadores devem estar mais envolvidos com a secreção de compostos tóxicos endógenos (SORBO et al., 2000).

Sendo os principais patógenos de plantas, os fungos não fogem a essa norma. Estudos sugerem que, em fungos patogênicos de plantas, vários transportadores do tipo ABC estão relacionados a patogenicidade. Durante o processo infeccioso, eles podem prover proteção contra compostos fungitóxicos produzidos por plantas, como as fitoalexinas (ZWIERS et al., 2000). Nesse contexto, a descoberta de substâncias inibidoras de transportadores do tipo ABC pode abrir novas perspectivas de combate ao *C. pernicioso*, já que até o presente momento a remoção de partes doentes do cacaueteiro e aplicação de fungicidas têm sido os métodos mais empregados para o controle da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro, mas nenhum deles é completamente eficiente.

Alguns inibidores para transportadores do tipo ABC da subfamília PDR, mais especificamente o PDR5, estão sendo relatados. Em leveduras, o PDR5 é uma proteína de membrana plasmática que consiste de 12 voltas transmembrana em α -hélice e 2 NBDs. Ela é responsável pelo efluxo de centenas de xenobióticos, estrutural e funcionalmente não relacionados, pela membrana plasmática. Apesar de ser um dos transportadores do tipo ABC melhor caracterizados, sua fisiologia ainda não está muito clara, embora, acredite-se que ela participa de processos de

detoxificação. Trabalhos recentes têm relatado a produção de inibidores de PDR5 por fungos antagonistas ao *C. pernicioso*, como o *Trichoderma viride* (MAMMUN et al., 2004).

O fungo saprofítico *T. viride* passou a ser considerado um potencial candidato a controle biológico da doença vassoura-de-bruxa, quando foi observado que “vassouras” colonizadas por ele nunca produziam basidiocarpos. Embora o mecanismo exato que favorece essa relação não esteja claro, parece que enzimas que atuam fora da célula estejam envolvidas nesse evento de antagonismo entre o *C. pernicioso* e o *T. Viride* (AZEVEDO et al., 2000).

Em uma recente pesquisa com o *Trichoderma* sp, foi constatada a presença de um isonitrilo que é um novo candidato a inibidor de PDR5 (Figura 4) (YAMAMOTO et al., 2005).

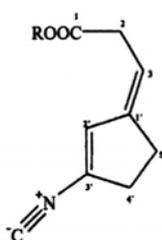


Figura 4 – Estrutura química de isonitrilo. Fonte: modificado de YAMAMOTO et al., 2005.

O estudo verificou que a presença do isonitrilo não alterou a expressão do gene PDR5 nem a quantidade da proteína expressada por ele. O resultado sugere que ele é um inibidor específico da função da proteína e que ele possui baixa toxicidade (YAMAMOTO et al., 2005).

2.6. Expressão de genes que codificam para transportadores do tipo ABC

Se os transportadores do tipo ABC podem bombear para o meio extracelular substâncias tóxicas que podem fazer mal à célula, é de se esperar que sua expressão aumente na presença dessas drogas. Realmente, muitos estudos têm demonstrado esse aumento de expressão.

Pesquisas com o *Mycosphaerella graminicola* demonstram, por exemplo, que os genes *MgAtr1* e *MgAtr2*, que codificam para transportadores do tipo ABC,

tem sua expressão induzida pela presença de antibióticos, metabólitos secundários de plantas e fungicidas (ZWIERS et al., 2000). Esses resultados sugerem que transportadores do tipo ABC de *M. graminicola* podem desempenhar uma função na proteção contra compostos tóxicos naturais e xenobióticos durante a patogênese.

Outro estudo analisou a participação de transportadores do tipo ABC do fungo *Botrytis cinerea* em interações com o ambiente natural (SCHOONBEEK et al., 2002). Esse estudo concluiu que o transportador do tipo ABC BcatrB protege o *B. cinerea* contra antibióticos produzidos por seu antagonista *Pseudomonas* spp. Isso tem implicações na eficácia do uso de antagonistas para controle biológico, uma vez que sugere que a pressão seletiva aplicada sobre patógenos, ou pela introdução de transgênicos que produzam mais antibióticos ou de agentes de biocontrole, pode direcionar para o surgimento de patógenos resistentes.

Outra importante conclusão desse estudo, é que a indução da expressão de um gene para transportador do tipo ABC em particular não implica que a proteína codificada seja a principal transportadora do composto que induziu a expressão.

Ainda é preciso mais pesquisas para esclarecer como múltiplos compostos não relacionados entre si podem induzir a transcrição de um gene em particular e ao mesmo tempo agirem como substratos da proteína que foi codificada.

Entre os compostos que podem induzir a expressão de genes para transportadores do tipo ABC estão o paraquat e 4-nitroquinoleína (4NQO).

2.7. Paraquat e 4-nitroquinoleína (4NQO)

Radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^-), são gerados com sub-produtos de oxidações biológicas. Essas moléculas são coletivamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) devida a sua grande reatividade, quando comparada ao oxigênio molecular (O_2) (FANG et al., 2002).

A fonte primária de superóxido é a cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria, onde, aproximadamente, 2% do oxigênio é incompletamente reduzido a ROS (ROEHRS et al., 2003). Esses superóxidos na

presença, mesmo que seja de traços, de íon férrico reagem com o peróxido de hidrogênio e produzem radicais via a reação de Haber-Weiss, também conhecida como a reação de Fenton (Figura 5) (VRANOVÁ et al., 2002). Os radicais hidroxil assim formados são extremamente tóxicos e são conhecidos por causar danos ao DNA, desnaturação de proteínas e peroxidação de lipídios.

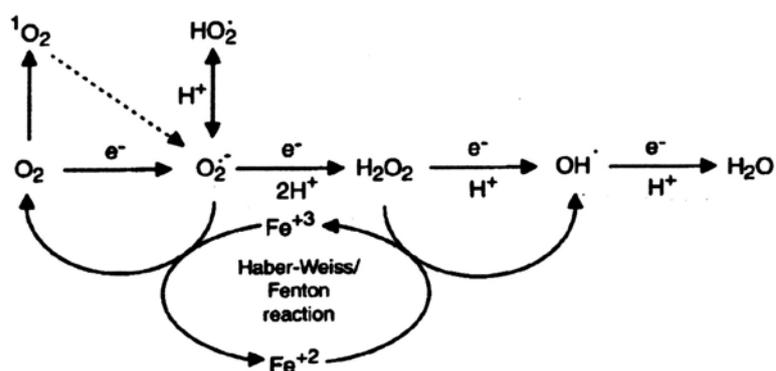


Figura 5 – Esquema da produção de ROS a partir do O₂. Fonte: VRANOVÁ et al., 2002

Além da cadeia respiratória, e a despeito do seu potencial de causar danos celulares, ROS também podem ser sintetizados pela célula para desempenhar funções específicas. Por exemplo, fagócitos produzem radicais superóxido para atacar bactérias que tenham sido fagocitadas (FANG et al., 2002). Há ainda compostos tóxicos, de natureza exógena, que podem gerar estresse oxidativo - entendendo-se estresse oxidativo como quando o nível de superóxido na célula exceder sua taxa de dismutação espontânea. Entre esses compostos que geram estresse oxidativo estão o paraquat (PAQ) e o 4NQO.

O paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) (Figura 6) é um herbicida muito usado na agricultura devido a seu baixo preço e por ser muito efetivo contra uma grande variedade de ervas daninhas (EKMEKCI et al., 2005).

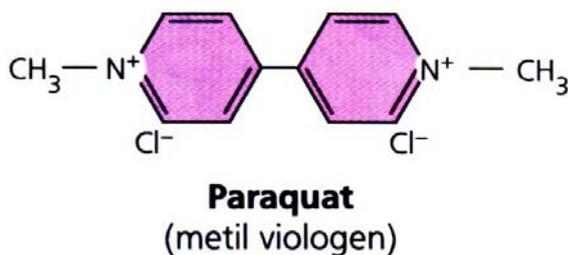


Figura 6 – Estrutura química do paraquat. Fonte: (RAVEN et al., 1999)

O mecanismo de ação do paraquat está possivelmente ligado a um ciclo redox (Figura 7) (BONNEH-BARKAY et al., 2005). Nesse ciclo, o paraquat é reduzido pela NAPH-citocromo c redutase. Quando o elétron do paraquat reduzido é passado para o O_2 , é produzido o superóxido O_2^- e outros ROS, como o peróxido de hidrogênio, o oxigênio nascente e radicais hidroxilas (AYAKI et al., 2005). Esses compostos são altamente reativos e podem causar mutações no DNA, desnaturação de proteínas, peroxidação de lipídios e danos à clorofila, levando a perda da integridade da membrana e morte celular.

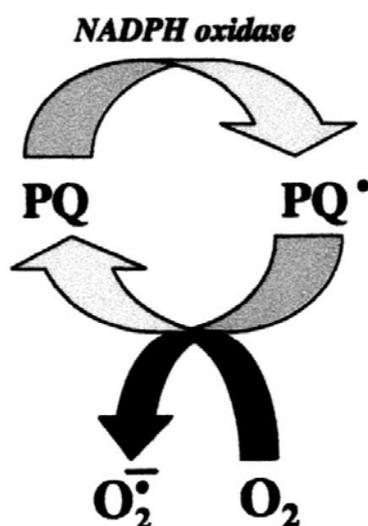


Figura 7 – Ciclo redox com participação de paraquat. Fonte: BONNEH-BARKAY et al., 2005.

O 4NQO é um composto altamente carcinogênico e mutagênico. Ele e seu metabólito reduzido, o 4-hidroxi aminoquinoleína 1-óxido (4HQA) ligam-se covalentemente a ácidos nucleicos e proteínas *in vivo*, causando danos a essas moléculas.

A conversão de 4NQO a 4HQA causa danos à célula porque o 4HQA, quando ativada via ciclo redox, é uma espécie reativa de nitrogênio que libera, principalmente o O_2^- , também gerando ROS (Figura 8).

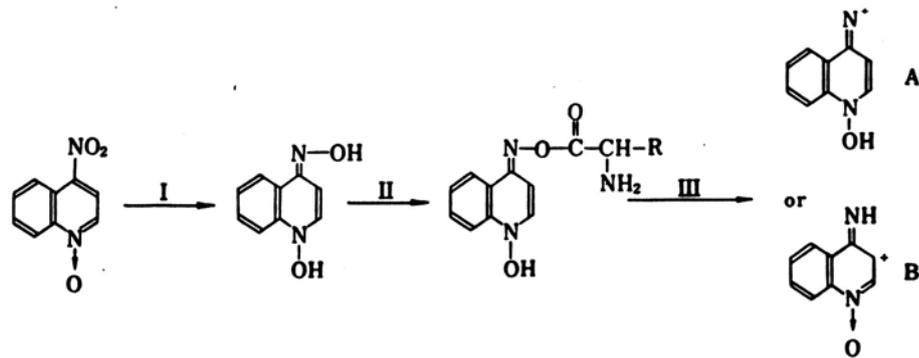


Figura 8 – Conversão de 4NQO a 4HQA. Fonte: TAKAHASHI et al., 1983.

2.8. Superóxido dismutase (SOD)

Além de compostos como o paraquat e o 4NQO, o metabolismo da própria célula pode gerar ROS. Em função disso, as células desenvolveram várias estratégias para protegê-las desses radicais. Algumas dessas estratégias têm presença constitutiva, enquanto que outras são induzidas em resposta a existência de um estresse oxidativo. Além disso, a localização na célula da ação antioxidante desempenha uma importante função na remoção e reparo do estresse oxidativo (HOHMANN et al., 1997). Entre as estratégias de defesa contra o estresse oxidativo, os genes *SOD* representam uma das mais importantes.

O aparecimento da enzimas *Sodp* está associado a proliferação de organismos fotossintéticos que começaram a produzir oxigênio há 2 bilhões de anos. Os efeitos tóxicos dos subprodutos da utilização do oxigênio gerou uma pressão seletiva que favoreceu a evolução de uma variedade de enzimas antioxidantes com função de neutralizá-los.

As *Sodp* estão presentes em todas as células e seu alto grau de conservação é sinal de sua importância na manutenção da homeostase celular (COX et al., 2003). Existem quatro classes de genes *SOD* conhecidas que diferem pelo seus cofatores: Mn, Fe, Ni e Cu, Zn. Em adição a esses diferentes cofatores, essas enzimas também mostram expressão e localização diferenciada na célula. Em *S. cerevisiae*, a qual tem somente duas dessas *Sodp*, a enzima contendo Cu, Zn (*Sod1p*) está localizada no citoplasma e no espaço entre as membranas mitocondriais, enquanto que a enzima contendo Mn (*Sod2p*) está localizada na

matriz mitocondrial. Essa localização está coerente com a função primária de Sod2p, que é de eliminar os radicais superóxido produzidos pela cadeia respiratória (Figura 9) (MISSAL et al., 2004).

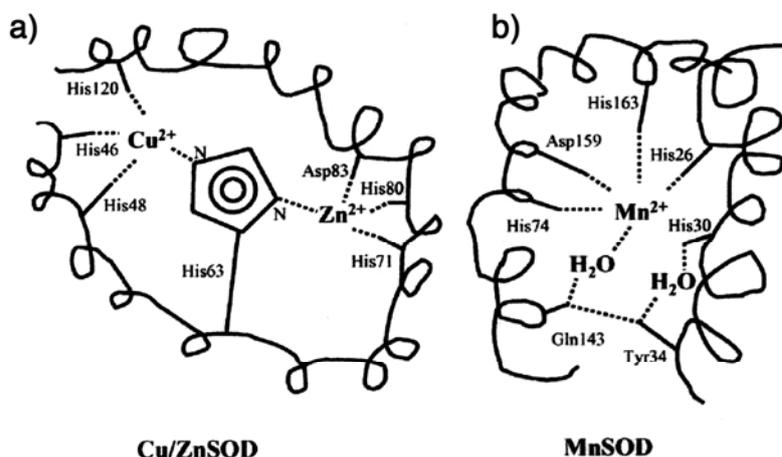


Figura 9 – Estrutura química de Sod1p (a) e Sod2p (b). Fonte: LANDIS et al., 2005.

É improvável que todos os tipos de Sodp tenham evoluído a partir de uma única proteína com função de proteger os organismos primitivos dos radicais livres gerados pela presença de O_2 . Isto porque, apesar de ambas possuírem a mesma função, elas são completamente diferentes nas suas estruturas, no metal que utilizam como co-fator e possuem mecanismos catalíticos completamente diferentes. A teoria é que *SOD1* evoluiu da duplicação e fusão de um gene, com posterior adição dos éxons I e III. É interessante notar que a taxa de mudança evolutiva de *SOD1* e *SOD2* difere consideravelmente no último bilhão de anos. Enquanto que *SOD2* evoluiu a uma taxa relativamente constante, *SOD1* evoluiu muito devagar no início e rapidamente nos últimos 100 milhões de anos. Ainda é necessário mais estudos para compreender as razões dessa diferença (ZELKO et al., 2002).

Como já foi visto, na cadeia respiratória, pode haver a produção de radicais hidroxil. Como esses radicais são muito ativos e difíceis de ser removidos, as células se protegem dessas moléculas removendo os seus precursores, o superóxido e o peróxido de hidrogênio. A Sodp catalisa a dismutação do superóxido para produzir oxigênio e peróxido de hidrogênio, o qual pode depois ser removido por outra enzima, a catalase (FANG et al., 2002). Portanto, a reação

catalisada pela Sodp é: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (MARTCHENKO et al., 2003).

A estrutura genômica completa do gene *SOD2* já foi determinada para humanos e ratos. Uma identificação e caracterização de *SOD2* bovino também foi relatada. Em todas essas espécies há uma grande conservação da estrutura e seqüência. A estrutura física de *SOD2* é composta de 5 éxons e 4 íntrons. **A região promotora em todas as três espécies partilham características em comum. Não foram identificadas regiões TATA ou CAAT “upstream”.**

A despeito do fato de que a expressão de *SOD2* ocorre em muitos tipos celulares e tecidos em níveis relativamente altos, ela também tem sua expressão regulada por vários fatores intra e extracelulares. A expressão de *SOD2* é regulada não somente a nível de transcrição, mas também a nível de tradução por uma proteína de ligação ao RNA. A 41pb, localizada na extremidade 3' do mRNA de *sod2* liga-se uma proteína específica que aumenta a eficiência da tradução. Essa proteína de ligação ao RNA ainda não teve sua identidade determinada (ZELKO et al., 2002).

A transcrição do gene *SOD2* em *Colletotrichum graminicola* foi fortemente relacionada com a produção de conídios. Isso sugere que *SOD2* possui uma regulação positiva em resposta aos estresse oxidativo gerado como parte da via de sinalização para a conidiogênese. Existem evidências de o estresse oxidativo é um importante regulador na formação de conídios em *Neurospora crassa*. Surpreendentemente, mutantes de *C. graminicola* para *sod2* parecem ser normais sob vários aspectos. Eles cresceram e formaram conídios como o tipo selvagem, tanto em meio rico como em meio mínimo. Eles germinaram normalmente, exibiram uma típica sensibilidade ao paraquat e parecem ser tão patogênicos como selvagens em folhas de milho (FANG et al., 2002).

3. Metodologia

3.1. Condições de crescimento do fungo.

O meio de cultura utilizado para o crescimento do *C. perniciosus* (CP-PD) foi composto de 2% de glicose, 2% de peptona e, quando sólido, foi adicionado 2% de ágar, autoclavado a 121°C, 20min, 1 ATM. A cultura estoque (discos) foi mantida em água a 25°C.

O *C. perniciosus* foi crescido em meio sólido por 5 a 7 dias a 25°C. Foram retirados três halos de, aproximadamente, 3mm de micélio de uma placa de meio sólido CP-PD. Esses três halos foram transferidos para um tubo contendo 5mL de meio líquido (tubo A) e 1g de “glass beads”. O tubo A foi agitado em vortex por 60 segundos para que o agar e as hifas fossem quebradas. Depois, 1mL desse meio líquido, contendo as hifas já quebradas, foi transferido para um erlenmeyer com 10 mL de meio líquido (Cultura A), colocados sob agitação ou não a 25°C, por 5-7 dias. O crescimento sob agitação resultou em várias esferas de micélio e o crescimento sem agitação em uma massa micelial disforme. De três a cinco esferas foram transferidas para um tubo contendo 10 mL de meio líquido (tubo B) e 1g de glass beads. Esse tubo foi agitado em vortex por 60 segundos, quebrando novamente as hifas, sendo esta cultura então utilizada para os experimentos de sensibilidade aos agentes mutagênicos. Alternativamente, a partir da Cultura A, foi inoculado 3 mL em 10 mL de meio líquido (CP-PD) sem agitação a 25°C para

obtenção de um volume maior de hifas gerando uma cultura B e então feito o experimento (Figura 10).

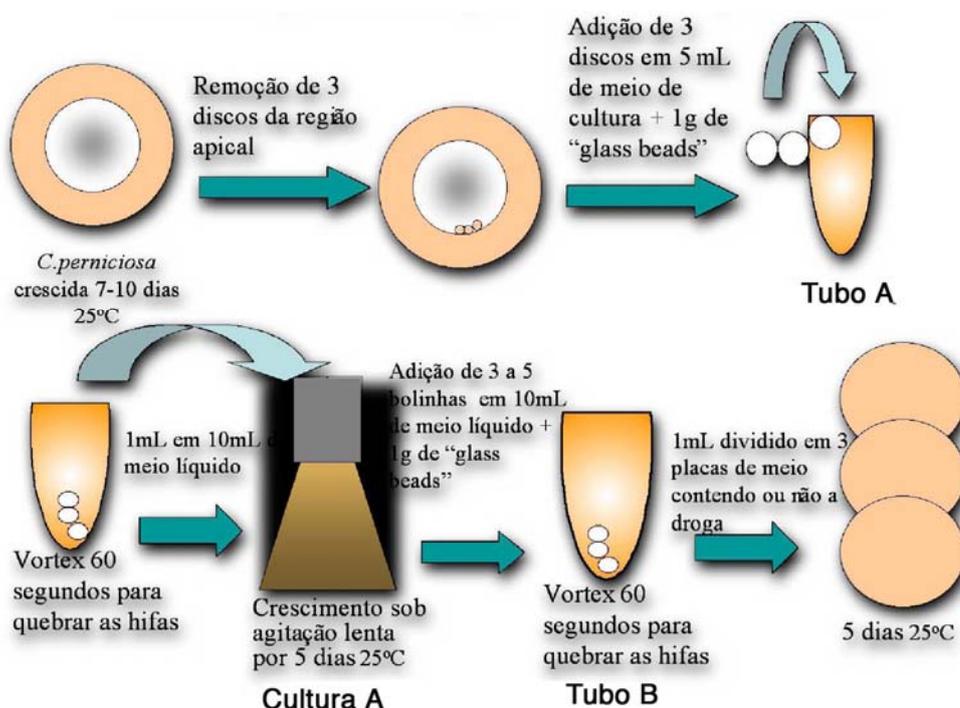


Figura 10 – Método de quebra de hifas para estudos quantitativos com *C. perniciosa*.

Os agentes mutagênicos químicos foram adicionados ao meio CP-PD sólido após autoclavação, em diferentes concentrações (Tabela 1)

Tabela 1 – Concentrações de agentes mutagênicos usados nos meios de cultura para estudo de curvas de sobrevivência de *C. perniciosa*.

Agente mutagênico	Concentração
4NQO	2, 4, 6 e 8 μ M
PAQ	25, 50, 100, 200, 400 μ M
H ₂ O ₂	0,5, 1, 1,25, 1,5, 2, 4mM

3.2. Exposição a agentes mutagênicos e sobrevivência

A sensibilidade aos agentes mutagênicos 4NQO, H₂O₂, PAQ foi determinada rotineiramente em meio sólido contendo concentrações diferenciadas

dos agentes químicos (Tabela 1) inoculando-se 1 mL da suspensão celular obtida da Cultura B em 3 placas de meio sólido. O resultado foi expresso em número de pseudo-colônias/mL de suspensão de hifas após 7 dias (25°C). A sobrevivência foi expressa em porcentagem (%). Os resultados apresentados são a média de pelo menos 3 experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão calculado pelo programa GraphPad Prism®.

A sensibilidade ao agente UVC foi determinada inoculando-se 1mL da suspensão celular obtida da Cultura B em 3 placas de meio sólido. As placas foram irradiadas com 6, 12, 24, 48 e 96J/m² e incubadas no escuro por 7 dias (25°C). A sobrevivência foi expressa em porcentagem (%). Os resultados apresentados são a média de pelo menos 3 experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão calculado pelo programa GraphPad Prism®.

Para extração total de RNA, foram inoculados 5mL de *C. pernicioso* a partir da Cultura B, em meio CP-PD líquido sem e com 4NQO (2, 4, 8µM) ou PAQ (2 E 4µM). O fungo *C. pernicioso* cresceu durante vinte dias a 25°C sem agitação. A extração foi feita a partir da massa micelial crescida durante o período.

3.3. Análises de bioinformática

A tradução das seqüências de DNA foram feitas no endereço eletrônico <http://au.expasy.org/tools/dna.html>.

Os BLASTs - Translated query vs. protein database (blastx) – foram realizados no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Os domínios protéicos codificados pelas seqüências foram obtidos no endereço eletrônico <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>.

A indicação de em qual compartimento celular a proteína exercerá sua função foi obtida por meio do programa “TargetP 1.1 Server”, disponível no endereço eletrônico <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>.

O alinhamento de seqüências foi feito pelo programa CLUSTAL W (1.83), disponível no endereço eletrônico <http://clustalw.genome.jp/>. A construção do

dendograma também foi feita por meio do programa CLUSTAL W (1.83), disponível no mesmo endereço eletrônico.

3.4. Primers e RT-PCR

A seqüência de DNA de *C. pernicioso* homóloga a genes para transportadores do tipo ABC utilizada para desenhar um *primer* foi obtida por meio de consulta ao banco de dados do “Projeto Vassoura de Bruxa” (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). Os *primers* foram desenhados a partir da seqüência de um dos *reads* disponíveis nesse banco de dados, cujo BLAST revelou homologia com genes para transportadores do tipo ABC. Esse *read* está contido na placa “CP02-S2-000-031-D05-UE.R” do projeto genoma do *C. pernicioso*. Os primers encomendados à empresa “Integrated DNA Technologies, Inc” foram:

F: 5'- GCT CGT GAA CGG CCC TCA AAG ACG -3'

R: 5'- CGT TCA GTG CGT CGG TAG CCT CTG CG -3'

Os *primers* da actina são específicos para *C. pernicioso*. Em um cDNA eles amplificam uma região com 165pb, enquanto que em DNA genômico, devido a presença de íntrons, a amplificação abrange 373pb. Os *primers* da actina são:

F: 5'- CCA CAA TGG AGG ACG AAG TCG- 3'

R: 5'- CCC GAC ATG GAG TCC TTC TG- 3'

Todos os PCRs foram feitos no termociclador “Mastercycler personal”, produzido pela Eppendorf. A DNA polimerase utilizada foi a “Taq DNA Polymerase”, com concentração de $5\text{u}.\mu\text{l}^{-1}$, produzida pela Fermentas.

A reação de PCR com os primers da actina foi preparada com $0,5\mu\text{l}$ de amostra de DNA genômico de *C. pernicioso*, $0,5\mu\text{l}$ de primer F+ (concentração de $10\text{pM}.\mu\text{l}^{-1}$), $0,5\mu\text{l}$ de primer R+ (concentração de $10\text{pM}.\mu\text{l}^{-1}$), $0,25\mu\text{l}$ de MgCl_2 (concentração final de 4mM), $1,25\mu\text{l}$ de buffer 10x, $0,5\mu\text{l}$ dNTP (concentração final de 0,2mM de cada), $0,2\mu\text{l}$ Taq ($5\text{ unidades}.\mu\text{l}^{-1}$) e $8,8\mu\text{l}$ de água (volume final de 12,5mL).

Foi verificado também se os primers para amplificar a seqüência homóloga a genes para transportadores do tipo ABC amplificavam a seqüência desejada realizando um PCR com a seguinte reação: 0,5µl de amostra de DNA genômico de *C. pernicioso*, 0,5 µl de primer F+ (concentração de 10µM), 0,5µl de primer R+ (concentração de 10µM), 0,25µl de MgCl₂ (concentração final de 4mM), 1,25µl de buffer 10x, 0,5µl dNTPs (concentração final de 0,2mM de cada), 0,2µl Taq (5 unidades por µl) e 8,8µl de água.

A reação de PCR teve um total de 35 ciclos e foi feita com um gradiente de temperatura com os seguintes valores: 56,5°C, 58,9°C, 61,7°C, 62,7°C e 63,8°C.

3.5. Extração de RNA total de *C. pernicioso*

O RNA total de *C. pernicioso* foi extraído a partir da cultura B (ver item 3.2), utilizando-se o Kit da QIAGEN RNeasy[®] Midi Kit (50), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram macerados, no máximo, 500mg de micélio em nitrogênio líquido. Foram misturados 5mL do tampão RLT com 50µL de β-mercaptanol. Adicionou-se essa mistura ao micélio macerado e esperou que ficasse líquido. Depois, o líquido foi transferido para um tubo de microcentrífuga e foi agitado vigorosamente em um vortex. O tubo, então, foi colocado a 56°C por 3 minutos. Centrifugou-se o material por 10 minutos a 3.000 x G. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se a ele 0,5 volumes de etanol 96 – 100% e misturou imediatamente, o que gerou um precipitado que foi ressuspendido com vigorosa agitação. A amostra foi aplicada em uma coluna Midi colocada em um tubo de 15mL, sendo que seu volume máximo é de 4mL. Centrifugou-se por 5 minutos a 3000 – 5000 x G. O líquido que passou pela coluna foi descartado. Adicionou-se 4mL do tampão RW1 à coluna e centrifugou por 5 minutos a 3000 – 5000 x G. O líquido que passou na coluna foi novamente descartado. Adicionou-se 4 volumes de etanol 96 – 100% ao tampão RPE. Depois, foram adicionados 2,5mL dessa mistura à coluna e centrifugou por 2 minutos a 3000 – 5000 x G. O que passou pela coluna foi descartado. Adicionou-se 2,5mL de RPE à coluna e centrifugou por 5 minutos a 3000 – 5000 x G (é importante que depois da centrifugação não sobre líquido na coluna). Removeu-se

a coluna do tubo e a transferiu para um novo tubo de 15mL. Colocou-se 150 ou 250µl de água RNase free diretamente sobre a membrana de sílica presente na coluna. Esperou-se um minuto e centrifugou por 3 minutos a 3000 –5000 x G. O RNA foi eluído pelo líquido que passou pela coluna.

3.6. Obtenção do cDNA

O RNA total obtido foi tratado com DNase I, Rnase-Free”, produzida pela Invitrogen® (10u/µl). O protocolo foi executado colocando-se 1µL da enzima, 2µL de água DEPC e 7µL de amostra e 1 µL de um inibidor de RNase (Fermentas Biotecnologia). Incubou-se a 37°C por 30 minutos e adicionou-se 1µL de EDTA. Por fim, incubou-se a 65°C por 10 minutos.

A partir desse RNA tratado com DNase foi obtido o cDNA utilizando-se o Kit “RevertAID™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase” produzida pela Fermentas®.

Para obter o cDNA colocou-se 6µL de amostra de RNA, com 2µL de oligodt e 11µL de água RNase Free. Incubou-se a mistura acima a 70°C e depois a resfriou no gelo. Depois, adicionou-se, nessa ordem, 4µL “5x reaction buffer”, 2µL de “10mM 4 dNTP mix”, 20 unidades de inibidor de ribonuclease e 19 µL de água DEPC. Incubou-se a mistura acima a 37°C por 5 minutos e foram acrescentados 200 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, Incubou-se a 42°C por 60 minutos. A reação foi parada por aquecimento a 70°C por 10 minutos e depois resfriada no gelo.

3.7. Normalização com base na amplificação com o *primer* da actina.

A normalização das quantidades de cDNA utilizadas nas reações de RT-PCR, obtido a partir do RNA total extraído do *C. pernicioso* crescido sob diferentes condições de cultivo, foi feita analisando-se a intensidade das bandas geradas

pelo RT-PCR da actina. O programa que analisou a intensidade das bandas amplificadas foi o “KodaK 1D 3.5”.

3.8. PCR para quantificação da expressão do gene para transportador do tipo ABC

O PCR com o primer desenhado para anelar na seqüência homóloga a genes para transportadores do tipo ABC foi feito respeitando os dados da quantificação da intensidade das bandas. A partir desses dados, foi definida a quantidade de cada amostra de cDNA que deveria ser utilizada no RT-PCR.

4. Resultados

4.1 Determinação de método para análises quantitativas em *C. pernicioso*

A Figura 11 mostra o crescimento de hifas quebradas obtidas na Cultura A e inoculadas em meio sólido CP-PD a 25°C. Pode-se observar, a partir de uma mesma massa micelial, a formação de uma pseudo-colônia após 7 dias de crescimento.

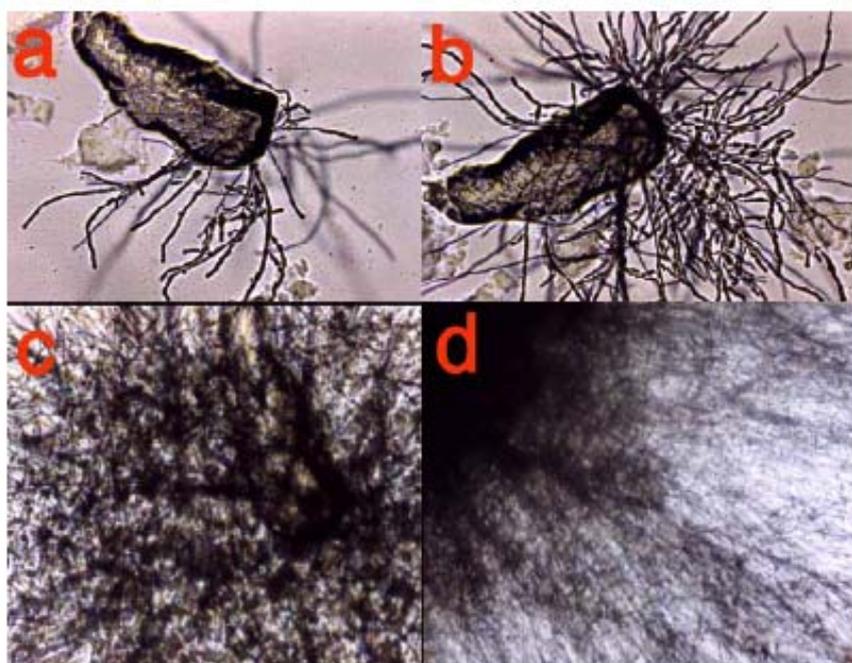


Figura 11 – Imagens ao microscópio óptico (aumento de 10X) de hifas quebradas e inoculadas em meio sólido para crescimento. a) 4 dias; b) 5 dias; c) 6 dias; d) 7 dias.

A Figura 12 apresenta o aspecto morfológico macroscópico diferenciado de hifas que cresceram sob e sem agitação após terem sido quebradas por *glass beads* (obtenção de Cultura A e Cultura B) que foram utilizadas durante os experimentos de sobrevivência aos agentes mutagênicos e extração total de RNA.

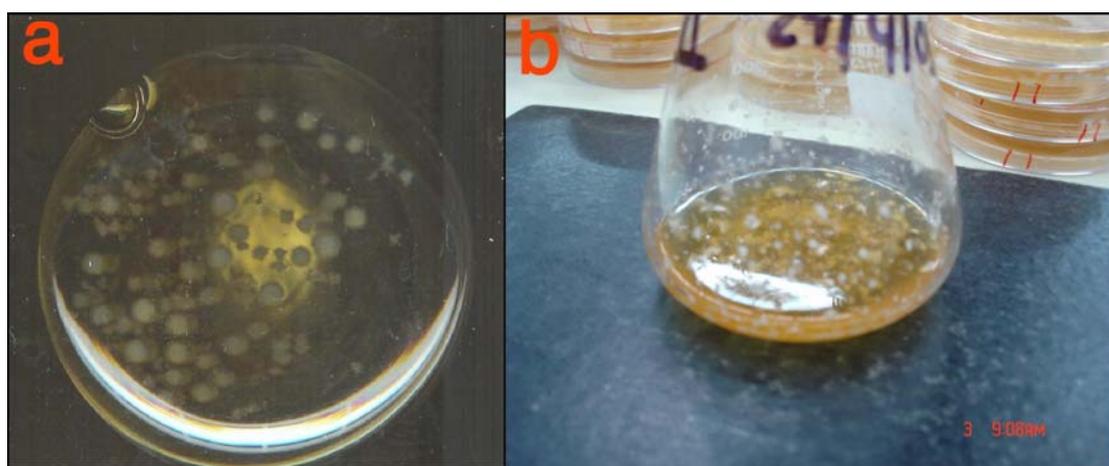


Figura 12 – a) hifas quebradas crescidas sob agitação, Cultura A; b) sem agitação, Cultura B.

A Figura 13 mostra o aspecto macroscópico do crescimento de hifas que foram quebradas por *glass beads* e inoculadas em meio sólido após 7 dias, incubada a 25°C.

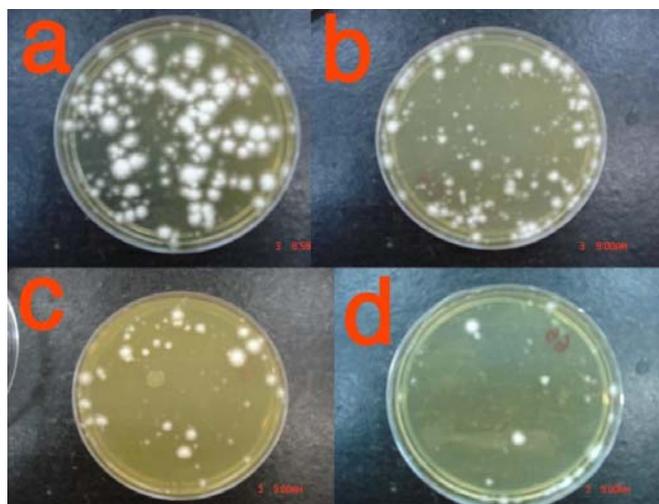


Figura 13 – Hifas quebradas crescidas após tratamento com luz UVC. a) zero; b) 24J/m²; c) 48J/m², d) 96 J/m².

4.2. Sensibilidade aos agentes mutagênicos

As Figuras 14, 15, 16 e 17 mostram gráficos de porcentagem de sobrevivência frente aos agentes PAQ, 4NQO, H₂O₂ e UVC.

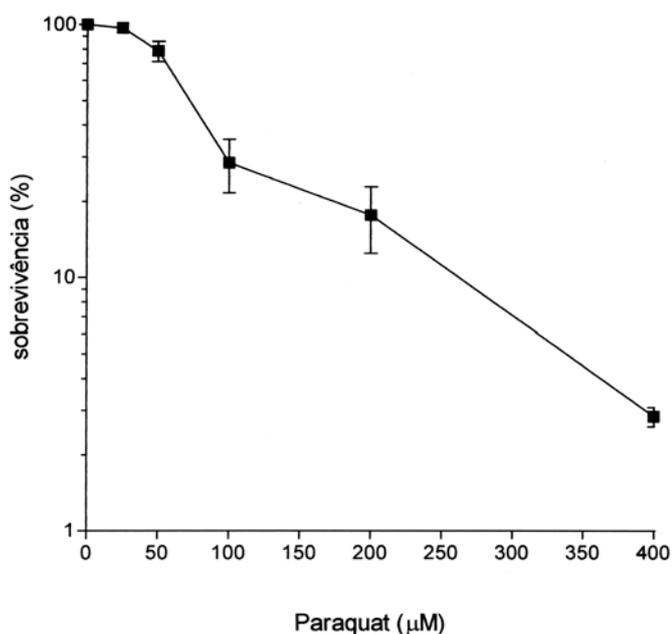


Figura 14 - Sobrevivência de *Crinipellis perniciosus* após exposição crônica ao agente PAQ.

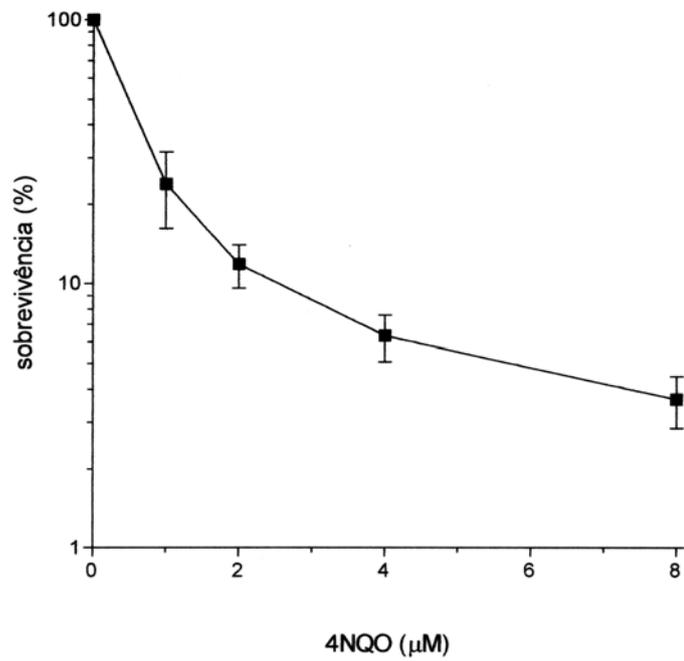


Figura 15 - Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* após exposição crônica ao agente 4NQO

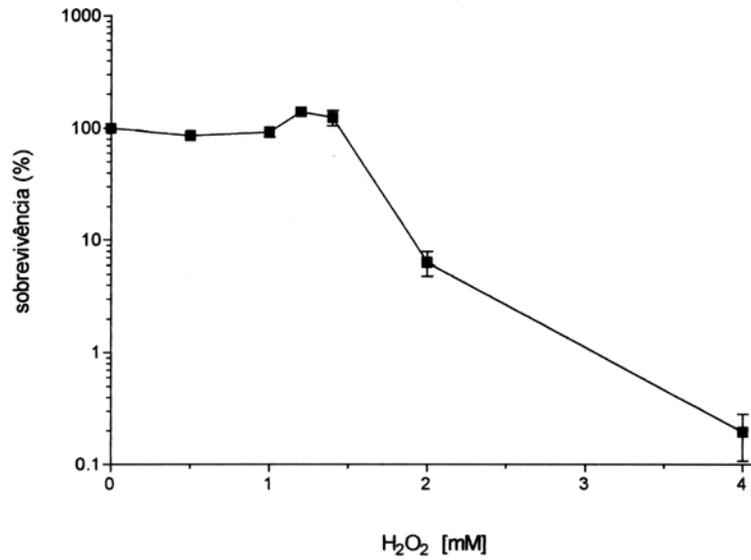


Figura 16 -. Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* após exposição crônica ao agente H₂O₂

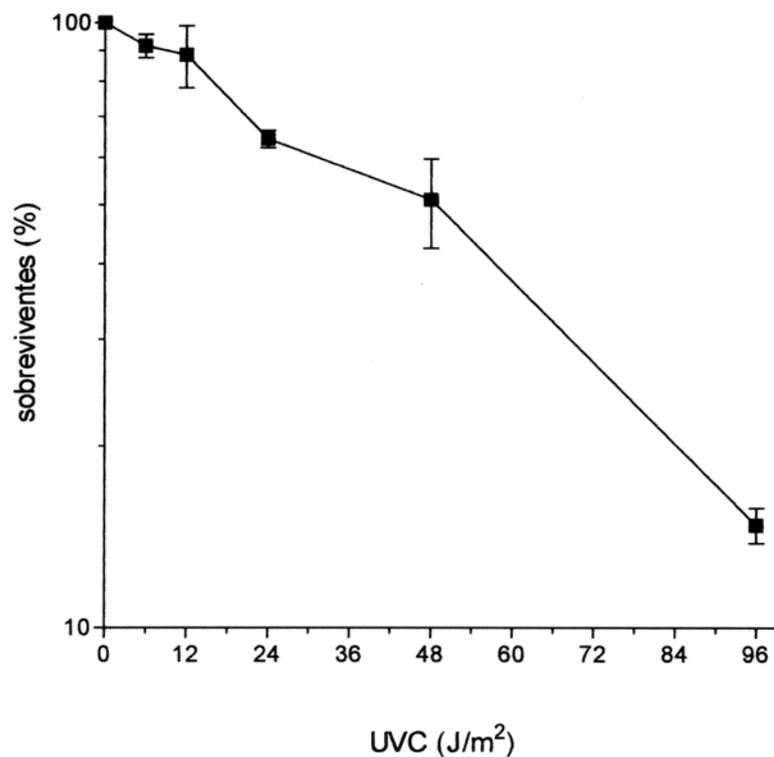


Figura 17 - Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* após exposição ao agente UVC.

4.3. Motivos Walker A e Walker B e seqüência de assinatura de genes para transportadores do tipo ABC

Segundo alguns estudos (ZWIERS et al., 2000) a seqüência consenso de aminoácidos para o motif Walker A na subfamília PDR5 é "TALMGASGAGKTLLD". Abaixo estão alguns *reads* que apresentaram grande homologia com essa seqüência.

- Placa CP02-S2-000-143-B10-UE.F

Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%)

Frame = +1

Query: 5 GASGAGKTLLD 16

GASGAGKTLLD

Sbjct: 289 GASGAGKTTLLD 324

- Placa CP02-S2-000-229-C10-UE.F

Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%)

Frame = -2

Query: 5 GASGAGKTTLLD 16

GASGAGKTTLLD

Sbjct: 476 GASGAGKTTLLD 441

- Placa CP02-S1-000-025-E01-UC.F

Identities = 13/15 (86%), Positives = 15/15 (100%)

Frame = +2

Query: 2 ALMGASGAGKTTLLD 16

A+MGASGAGK+TLLD

Sbjct: 290 AIMGASGAGKSTLLD 334

- Placa CP02-S3-036-218-B02-EM.F

Identities = 12/14 (85%), Positives = 13/14 (92%)

Frame = +3

Query: 3 LMGASGAGKTTLLD 16

+ GASGAGKTTLLD

Sbjct: 306 VQGASGAGKTTLLD 347

Outras seqüências apresentaram uma elevada homologia com a seqüência de assinatura de genes para transportadores de tipo ABC e com a seqüência que caracteriza o motivo Walker B. Essas seqüências consenso são:

Assinatura

Walker B

EGLNVEQRKRLTIGVELTAKPKLLVFLDEPTSGGLDS

Abaixo estão algumas seqüências que apresentaram elevada homologia com essas seqüências.

- Placa CP02-S1-000-016-F05-EM.F

Identities = 33/36 (91%), Positives = 35/36 (97%)

Frame = -2

Query: 1 EGLNVEQRKRLTIGVELTAKPKLLVFLDEPTSGGLDS 36

EGLNVEQRKRLTIGVEL+AKP+LL+FLDEPTSGGLDS

Sbjct: 344 EGLNVEQRKRLTIGVELAAKPELLLFLDEPTSGGLDS 237

- Placa CP02-S3-036-179-B11-EM.F

Identities = 31/35 (88%), Positives = 34/35 (97%)

Frame = +3

Query: 2 GLNVEQRKRLTIGVELTAKPKLLVFLDEPTSGGLDS 36

GLN+EQRKRLTIGVEL+AKP+LL+ FLDEPTSGGLDS

Sbjct: 294 GLNIEQRKRLTIGVELVAKPELLLFLDEPTSGGLDS 398

4.4. Análise do gene *SOD2*

A biblioteca de cDNA do *C. pernicioso* revelou a presença de seqüências que são homólogas a seqüências conhecidas de genes que codificam para superóxido dismutase (SOD). Entre elas encontra-se a seqüência de 472 pb abaixo.

GGGGGACCCAACAACAATGTTTCGCTCTCACCAGAAACGCTCTTCGCC
TGCTTTCGCTCGTACTTTTGCAGCTCCAAGCACTGCTGCTTCTCTTCAT

ACACTCCCCGAGCTTCCATATGCCTACAATGACCTCGAACCTCATATTT
 CTGAGGAAATTATGAAGCTTACCACCAAAGCACCATCAAACATACGT
 TAACGGTCTCAACGCTGCAGAAGAGTCATATGCCAAGGCCCTTCAAC
 CAAGGACAAAATTGCACTTCAGGCCGCGTTAAAGTTCAATGGTGGCGG
 TCACATTAATCATTCTCTGTTTTGGAAAACCTTGCTCCTGCAAACAGTG
 ATGGTGGAAAGCTCGCCGACGGACCTTTGAAGCAGGCTATTGAACGTG
 ACTTTGGTTCAGTTGAGGACTTTAAGAAGTCATTCAATGCCAAGACGGC
 TGCTATTCAGNGGTTACGTTGGAAATGGGGTGAT

A tradução dessa seqüência gera o seguinte resultado (161 aa):

G D P T T **Met** F A L T R N A L R P A F A R T F A A P S T A A S L H T L P E L P
 Y A Y N D L E P H I S E E I **Met** K L H H Q K H H Q T Y V N G L N A A E E S Y A
 K A P S T K D K I A L Q A A L K F N G G G H I N H S L F W K N L A P A N S D G
 G K L A D G P L K Q A I E R D F G S V E D F K K S F N A K T A A I Q X L R W K
 W G D

A análise por meio de BLASTp dessa seqüência de aminoácidos aponta dois domínios (Figura 18).



Figura 18 – Domínios revelados por blastp de uma seqüência de aminoácidos codificada por uma seqüência de DNA de *C. pernicioso* homóloga a genes *SOD*.

A análise por meio do programa TargetP 1.1 Server indica que há nessa proteína uma seqüência de endereçamento para a mitocôndria, que é o que se espera de uma proteína Sod2p, uma vez que ela é codificada por um gene nuclear mas desempenha sua função no interior da mitocôndria (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação de peptídeo sinal para endereçamento de proteína.

Nome	comprimento	mTP	SP	Outra	Loc
Seqüência	161	0.568	0.044	0.497	M

onde: **mTP** é a indicação de haver um peptídeo sinal endereçando a proteína para a mitocôndria. **SP** é a indicação de haver um peptídeo sinal endereçando a proteína para secreção. **Outra** é a indicação de haver um peptídeo sinal endereçando a proteína para outro compartimento celular. **Loc** é a conclusão sobre qual o destino mais provável da proteína, sendo que **M** indica que é a mitocôndria.

O alinhamento dos domínios do gene *SOD2* de *C. perniciosus* com genes *SOD2* de outros organismos possibilitou a construção de um dendograma (Figura 19).

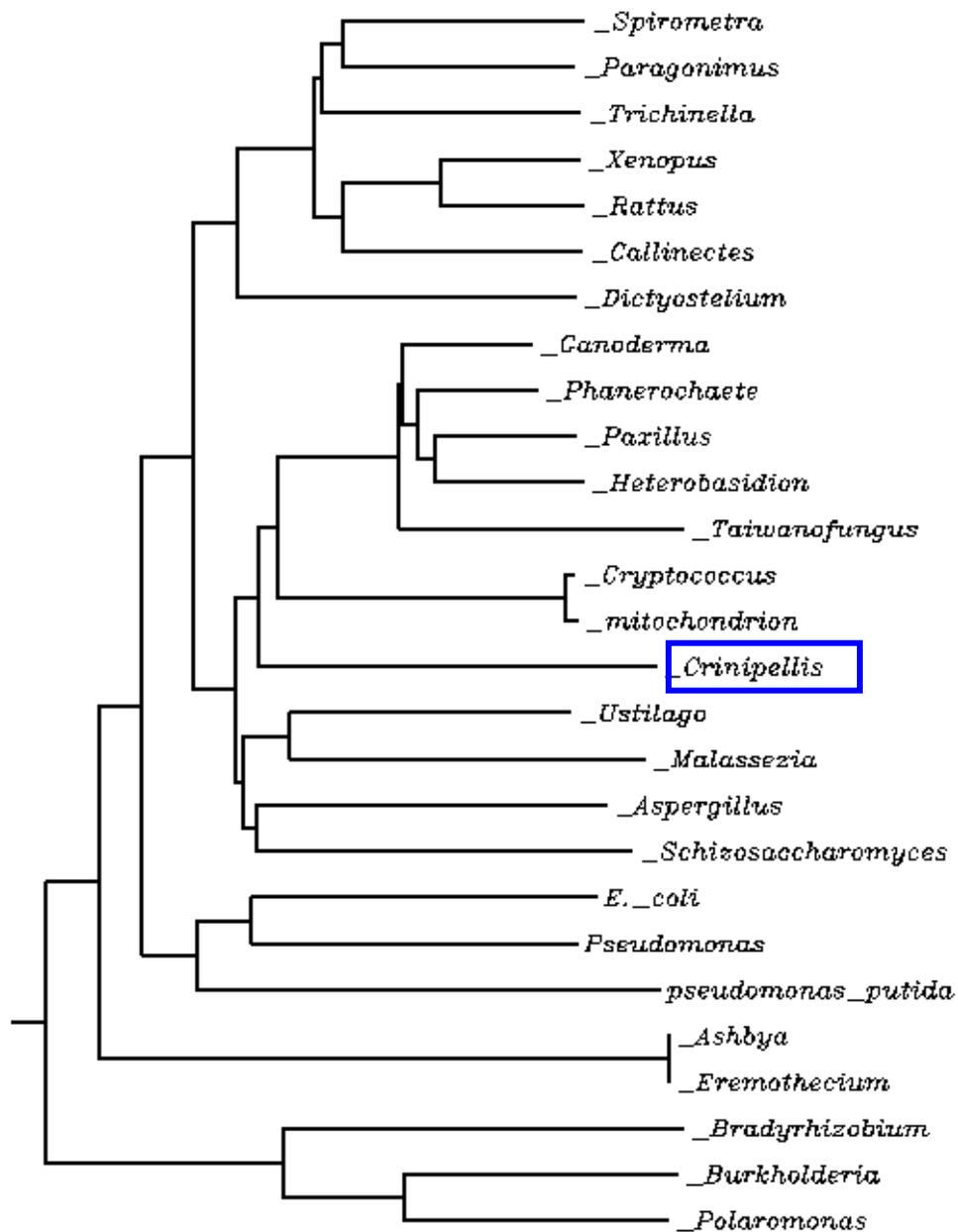


Figura 19 – Dendograma construído com base no alinhamento de seqüência de aminoácidos codificados por seqüência de DNA de *C. pernicioso* homóloga a genes que codificam para a proteína Sodp.

4.5. Desenho e teste de *primers* para seqüência homóloga a genes para transportadores do tipo ABC

Entre as seqüências disponíveis no banco de dados do projeto genoma do *C. pernicioso*, foi escolhido para fazer o estudo de expressão, aquele cuja seqüência (508 pb) encontra-se abaixo.

TGGACCTGACCTCTATTAGTACTAATTGACAACCCCCAGTCATGCTCATGACA
CTTCGGTAACTTGGTAAACCAGATCATGCCGCATTTTGTACCCCAACGAGCAC
TGTAGTGAAG**GCTCGTGAACGGCCCTCAAAGACGTATTCGTGGCAATCCTTTA**
TGCTGGCAAATATAATGGCAGAAATACCATGGAATAGTCTTGCGGCCGTGA
TCATCTTTGTATGCTGGTACTATCCTATTGGAATGTATAGAAACGCAGAGGC
TACCGACGCACTGAACGAACGTGGTGGTCTAATGTTCCCTGCTTATATGGAGG
TAAGGCATTCGTTTAGGTAAGTACTGATCCTCGTCAAATACTTACATCCCCGCAGC
TTTTTGCTCTTTACTTCAACCTTACCAATTTTCATCATCGCTGGTGTGACGTC
GCTGAAACTGGCGGTAATATTGCGACTTTATTGTTCTCTCTCTGCTTGGTATTC
TGCGGGTGAGTGATTTGAACTTGTCTTGGGTCTG

Da seqüência acima, foi escolhido o trecho abaixo para ser amplificado, gerando um fragmento de 163pb.

GCTCGTGAACGGCCCTCAAAGACGTATTCGTGGCAATCCTTTATGCTGGCAA
ATATAATGGCAGAAATACCATGGAATAGTCTTGCGGCCGTGATCATCTTTGTA
TGCTGGTACTATCCTATTGGAATGTATAGAAACGCAGAGGCTACCGACGCACT
GAACG.

A tradução dessa seqüência gera o seguinte conjunto de aminoácidos:

ARERPSKTYSWQSFMLANIMAEIPWNSLAAVVIIFVCWYY
PIGMYRNAEATDALN

O BLASTP dessa seqüência mostrou que ela possui homologia com prováveis genes de transportadores do tipo ABC de diversos organismos. Essa seqüência apresentou maior semelhança com um gene da família PDR de *Aspergillus fumigatus* (Figura 20).

```
> gi|66850438|gb|EAL90765.1 ABC transporter, putative [Aspergillus fumigatus Af293]
gi|44890030|emb|CAF32148.1 ABC transporter, putative [Aspergillus fumigatus]
      Length=1497

      Score = 79.0 bits (193), Expect = 4e-14
      Identities = 38/59 (64%), Positives = 48/59 (81%), Gaps = 6/59 (10%)

Query 2      RERPSKTYSWQSFMETLANIMETAEIPWNSLAAVVIIFVCWYYPIGMETYRNAEATDALN 60
              RERPSKTYSW++FM ANI+ E+PWN+L A +IFVCWYYPIG+ YRNAE TD+++
Sbjct 1256    RERPSKTYSWKAFMA--ANII--VELPWNTLMAFLIFVCWYYPIGL--YRNAEPTDSVH 1308

> gi|66850746|gb|EAL91073.1 ABC drug exporter AbcA [Aspergillus fumigatus Af293]
      Length=1452

      Score = 77.4 bits (189), Expect = 1e-13
      Identities = 35/59 (59%), Positives = 50/59 (84%), Gaps = 6/59 (10%)

Query 2      RERPSKTYSWQSFMETLANIMETAEIPWNSLAAVVIIFVCWYYPIGMETYRNAEATDALN 60
              R+RP+KTYSW++F+ +ANI+ E+PWNSL +V++F+CWYYPIG+ YRNAE TDA++
Sbjct 1211    RDRPAKTYSWKAPL--IANIV--VELPWNSLMSVLMFLCWYYPIGL--YRNAEPTDAVH 1263

> gi|18072460|emb|CAD10327.1 putative ABC transporter [Aspergillus fumigatus]
      Length=1452

      Score = 77.4 bits (189), Expect = 1e-13
      Identities = 35/59 (59%), Positives = 50/59 (84%), Gaps = 6/59 (10%)

Query 2      RERPSKTYSWQSFMETLANIMETAEIPWNSLAAVVIIFVCWYYPIGMETYRNAEATDALN 60
              R+RP+KTYSW++F+ +ANI+ E+PWNSL +V++F+CWYYPIG+ YRNAE TDA++
Sbjct 1211    RDRPAKTYSWKAPL--IANIV--VELPWNSLMSVLMFLCWYYPIGL--YRNAEPTDAVH 1263
```

Figura 20 – resultado do blastx da seqüência de DNA de *C. pernicioso* escolhida para fazer o estudo sobre transportadores do tipo ABC.

A análise do gene completo para transportador do tipo ABC em *A. fumigatus*, permitiu a identificação dos domínios protéicos (Figura 21 e quadro 1).



Figura 21 – Esquema destacando os domínios de um transportador do tipo ABC, subfamília PDR, de *A. fumigatus*.

Quadro 1 – relação entre os domínios protéicos de um transportador do tipo ABC de *A. fumigatus* com as seqüência de DNA no gene que os codificam.

Domain	Start	End	Bits	Evalue	Alignment	Mode
ABC tran	188	388	92.00	1.5e-24	Align	ls
ABC2 membrane	504	714	236.60	4.5e-68	Align	ls
PDR_CDR	725	871	258.00	1.7e-74	Align	ls
ABC tran	882	1071	89.60	7.9e-24	Align	ls
ABC2 membrane	1173	1391	205.90	8e-59	Align	ls
PDR_CDR	1457	1477	21.20	2.4e-05	Align	fs

O alinhamento entre a seqüência de nucleotídeos de *C. perniciososa* e de *A. fumigatus* ocorre entre as posições 1256 e 1308 (Figura 20). Conforme o quadro 1, essa seqüência é justamente a que codifica o domínio transmembrana. Portanto, em comparação com o gene para transportador do tipo ABC em *A. fumigatus*, a região amplificada pelo PCR, nesse trabalho, é a que está indicada pela seta na figura 22.



Figura 22 – Ilustração mostrando a região homóloga entre a seqüência de DNA que foi amplificada nesse trabalho e um gene para transportador do tipo ABC de *A. Fumigatus*.

Deste modo, para amplificar, via PCR, a região indicada pela figura 19 foram utilizados os *primers* desenhados para tal, e descritos anteriormente.

A eficiência dos *primers* foi verificada realizando-se um PCR, tendo como amostra o DNA genômico extraído do *C. pernicioso*. A amplificação foi testada em diferentes temperaturas (56,5°C, 58,9°C e 61,7°C), sendo que todas resultaram em ampliações com o tamanho esperado (Figura 23).

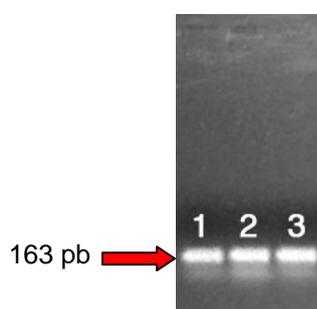


Figura 23 – resultado da amplificação, tendo como amostra o DNA genômico de *C. pernicioso*. 1) 56,5°C; 2) 58,9°C; 3) 61,7°C.

4.6. Análise da expressão gênica

O RNA total foi extraído de seis culturas de *C. pernicioso*, conforme mostra a Figura 24.

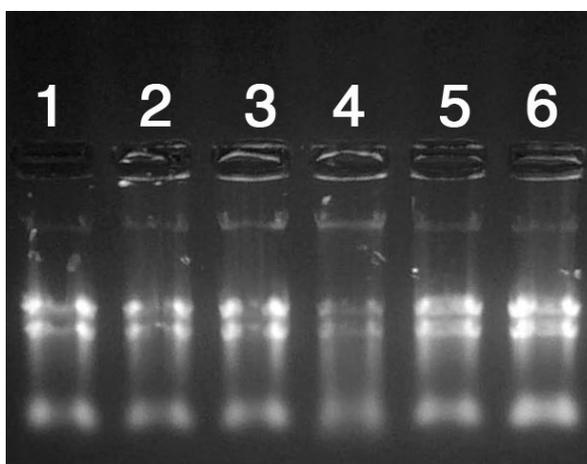


Figura 24 – Resultado da extração de RNA total de *C. pernicioso* em diferentes culturas. 1) controle; 2) em presença de 4NQO 2 μ M; 3) 4NQO 4 μ M; 4) 4NQO 8 μ M; 5) PAQ 2mM; 6) PAQ 4mM.

Uma amplificação controle (RNA tratado) não gerou bandas, confirmando a total degradação de um possível DNA contaminante na amostra. Isso é importante visto que o fragmento amplificado possui o mesmo tamanho, seja a partir do DNA genômico ou cDNA.

Após fazer a transcrição reversa desses RNAs, foi feito o PCR com o *primer* da actina para normalizar a quantidade de amostra que deveria ser aplicada para verificar se houve ou não alteração na expressão (Figura 25). A ausência de um fragmento de actina maior (373 pb) (com íntron), confirmou a total degradação do DNA contaminante.



Figura 25 – Resultado da normalização do RT-PCR com base na amplificação da actina. Os valores utilizados para cada amostra, de acordo com a normalização foram equivalentes a: 2 μ L para a amostra 1, 2,58 μ L para a amostra 2, 2,52 μ L para a amostra 3, 2,52 μ L para a amostra 4, 2,2 μ L para a amostra 5 e 2,16 μ L para a amostra 6. M) marcador de peso molecular (100pb); 1) controle; 2) em presença de 4NQO 2 μ M; 3) 4NQO 4 μ M; 4) 4NQO 8 μ M; 5) PAQ 2mM; 6) PAQ 4mM.

Respeitando os valores definidos pela normalização, foi feito o RT-PCR com o primer de transportador do tipo ABC (Figura 26).



Figura 26 – resultado da amplificação com *primer* para seqüência homóloga a gene para transportador do tipo ABC. M) marcador de peso molecular (100pb); 1) zero; 2) em presença de 4NQO 2μM; 3) 4NQO 4μM; 4) 4NQO 8μM; 5) PAQ 2mM; 6) PAQ 4mM

O resultado acima mostra que não houve uma alteração na expressão do gene para transportador do tipo ABC da subfamília PDR, quando o *C. perniciosus* cresceu sob concentrações crescentes de PAQ e 4NQO.

5. Discussão

5.1. Desenvolvimento de um método para análises quantitativas de efeitos de agentes químicos em *C. pernicioso*

Trabalhos que analisam os efeitos de diferentes agentes químicos sobre o crescimento de bactérias e leveduras costumam ser feitos pela contagem do número de colônias que se desenvolvem em função da variação da concentração destes compostos químicos em contato com os microrganismos. Em fungos miceliais, como o *C. pernicioso*, o trabalho quantitativo é dificultado porque esses fungos não formam colônias a partir de uma unidade unicelular. Por isso, muitos trabalhos apresentam uma análise semi-quantitativa em que se avalia, por exemplo, o tamanho de uma zona de inibição ao redor de um composto químico, em que o micélio não cresce (SCHOONBEEK et al., 2002).

A quebra das hifas por *glass beads* mostrou-se ser um método vantajoso para trabalhos com fungos filamentosos porque permitiu a comparação entre as quantidades de “unidades/agregados formadores de micélio” entre culturas do fungo que cresceram sob condições diferentes. As diferenças nas quantidades de unidades em cada placa em função da variação do agente mutagênico, com reprodutibilidade, foi o que tornou possível fazer uma análise quantitativa nesse trabalho (Figura 13).

Os dados quantitativos obtidos com reprodutibilidade permitiram a elaboração de curvas de sobrevivência comparáveis às obtidas com organismos celulares como levedura *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias, como *Escherichia coli* dentro de um grau admissível de confiança, em virtude dos desvios padrões terem se mostrado relativamente pequenos. Isto permitiu a construção de gráficos, gerando resultados mais precisos, confiáveis e reprodutíveis.

5.2. Sensibilidade aos agentes PAQ, 4NQO e H₂O₂

A partir da determinação das condições de crescimento e o desenvolvimento de um método capaz de obter unidades de micélios com características quase unicelulares, estabeleceu-se as doses sub-letais de crescimento para posterior análise da expressão gênica.

As figuras 14, 15 e 16 mostram uma nítida relação dose x resposta, ou seja, com o aumento da dose do agente mutagênico, há o aumento da sensibilidade expressa em % de sobreviventes.

As doses utilizadas para os agentes 4NQO (UV-mimético), PAQ e H₂O₂ são comparáveis àquelas utilizadas em organismos como na levedura *S. cerevisiae* em termos de dose de exposição, por exemplo, 4NQO na levedura até 1µM e H₂O₂ entre 1 e 4mM. (Pungartnik et al., 1999). Ao compararmos a sobrevivência entre os dois organismos (*C. perniciosus* e *S. cerevisiae*), observamos que a capacidade de reparo das lesões induzidas por estes agentes é semelhante. Em uma linhagem selvagem de levedura *S.cerevisiae*, a exposição crônica ao agente 4NQO gera aproximadamente 10% de sobreviventes, e em *C. perniciosus*, na mesma dose e mesmas condições, 20% (Figura 14). O mesmo acontece com o

agente H_2O_2 , onde em levedura *S.cerevisiae* obtém-se aproximadamente 1% de sobrevivência e em *C. pernicioso* 5% na dose de 1mM (Fig. 15). No caso do agente H_2O_2 , na concentração em torno entre de 1 e 1.4mM há um estímulo ao desenvolvimento do fungo, o que já era esperado porque se sabe que um pouco de estresse oxidativo pode estimular o desenvolvimento (HOHMANN, 1997). Quanto ao agente PAQ, *C. pernicioso* parece ser um pouco mais sensível (aproximadamente 10x), uma vez que a sobrevivência em torno de 1% ocorre em levedura WT exposta a PAQ (4mM) e *C. pernicioso* exposta a PAQ (0.4mM) (Fig. 16). Isto pode ser explicado uma vez que a levedura possui um metabolismo oxidativo independente de mitocôndria em meio contendo glicose (MARIS et al., 2000).

Quanto ao agente UVC, observamos uma capacidade de reparo de lesões induzidas também bastante semelhantes. *S.cerevisiae* possui uma sobrevivência em torno de 10% quando exposta a 50-60J/m² (BRENDDEL et al., 1970; HENRIQUES et al., 1980) e *C. pernicioso* quando exposto a 96J/m².

O conhecimento dessas doses sub-letais permitiu definir o tratamento dado ao *C. pernicioso* para o estudo de expressão gênica, bem como facilitará pesquisas posteriores envolvendo o gene *SOD* que confere proteção contra o estresse oxidativo.

5.3. Motivos Walker A e Walker B e seqüência de assinatura.

As análises de bioinformática foram importantes tanto para fornecer subsídios para o trabalho de expressão gênica como por trazer novas informações que abriram novas perspectivas de estudo do *C. pernicioso*.

Algumas seqüências de DNA já reveladas pelo projeto genoma do *C. pernicioso* apresentam uma grande homologia com seqüências que codificam os motivos Walker A e Walker B, além de homologia com a seqüência de assinatura de genes para transportadores do tipo ABC da subfamília PDR.

O alto grau de identidade, variando de 85 a 100%, revelado pelo BLAST confirma estudos anteriores que mostram que pequenas alterações nesses motivos podem inviabilizar a função ATPásica dos domínios NBD (ANANTHARAMAN et al., 2001), uma vez que a hidrólise do ATP é cooperativa

entre os dois domínios NBD presentes em transportadores do tipo ABC (BORGES et al., 2001).

Um melhor entendimento da importância desses motivos para o mecanismo de hidrólise do ATP pode fornecer informações importantes sobre como bloquear a ação desses transportadores facilitando o combate a fungos patógenos.

5.4. Análise do gene *SOD2*

Como esperado, a construção do dendograma mostrou que a seqüência de DNA de *C. pernicioso* homóloga a genes *SOD2* apresenta maior similaridade com fungos basidiomicetos.

A análise da seqüência homóloga a genes *SOD2* revelou a presença de um domínio de ligação ao Mn e Fe (Figura 19). As superóxidos dismutases contendo ferro (FeSODs) e as que contém manganês (MnSODs) apresentam uma significativa similaridade na seqüência de DNA que as codificam e em suas estruturas e, portanto, são relacionadas evolutivamente. Já as superóxidos dismutases que contém cobre e zinco (Cu/Zn SODs), pertencem a uma linhagem diferente (TABARES et al., 2003).

O fato de Sodp contendo Fe e Mn serem mais comuns em procariotos e mitocôndrias (SCHÄFER et al., 2003) pode ser explicado porque as mitocôndrias evoluíram a partir de bactérias aeróbias.

MnSOD requer Mn e não Fe para sua atividade. Entretanto, quando MnSOD é expressada por *Escherichia coli* em um ambiente rico em sais de ferro, ela substitui o Mn ao Fe (WHITTAKER, 2003). É necessário a realização de mais estudos para se certificar de qual co-fator essa proteína em *C. pernicioso* precisa para manter sua atividade.

5.5. Desenho dos *primers*

Como já discutido, os domínios NBD de transportadores do tipo ABC são muito conservados. Portanto, para o objetivo do presente trabalho, não faria sentido desenhar um primer que anelasse a essa região, uma vez que poderia amplificar vários genes.

Entre os *reads* cujo BLAST apontou uma homologia com genes conhecidos para transportadores do tipo ABC, foi escolhido para desenhar o *primer* aquele em que a seqüência de bases codifica o domínio TMD, uma vez que esse domínio é bastante variável, o que nos permitiu estudar um gene específico. Além de codificar um domínio TMD, buscou-se dentro desse *read* um trecho em que não houvesse íntrons.

Os testes dos primers utilizando como amostra o DNA genômico e cDNA de *C. pernicioso* mostraram que eles estavam corretamente desenhados uma vez que, em ambos os casos, amplificou uma seqüência de mesmo tamanho, o que era esperado uma vez que eles foram desenhados de tal forma a não amplificar um íntron.

5.6. RT-PCR

O estudo da expressão do gene para transportador do tipo ABC da subfamília PDR5 em *C. pernicioso* indica claramente a presença de um nível basal de transcrição - uma expressão constitutiva de genes para transportador do tipo ABC é comum em vários genes dessa família (ZWIERS et al., 2000). Entretanto, nenhuma diferença significativa pôde ser mensurada entre as quantidades de RNA extraído de micélio não tratado e micélio tratado com paraquat e 4NQO, sob as condições do experimento.

O fato das drogas paraquat e 4NQO não terem induzido a expressão do gene pode ser explicada pelo tempo de exposição do fungo à droga. Nesse experimento, o *C. pernicioso* cresceu num meio com a droga. Até o crescimento ter produzido uma quantidade de micélio suficiente para fazer a extração do RNA transcorreu um tempo de mais de duas semanas. É possível que após um período de tempo menor a expressão do gene se estabilize num patamar basal. Será necessário aplicar uma metodologia que estude a expressão desse gene em vários limites de tempo, desde horas de exposição até dias, uma vez que genes para transportadores do tipo ABC podem apresentar diferenças na regulação ao longo do tempo (ZWIERS et al., 2000).

Por outro lado, mesmo fazendo uma análise em função de vários períodos de tempo, pode ser constatado que, ainda assim, não há uma indução na expressão. É possível que o paraquat e o 4NQO estimulem a expressão de outros

genes para transportadores do tipo ABC, mas não esse gene em questão (ANGERMAYR et al., 1999). Também é sabido que o fato de não haver um efeito na expressão, não significa que essas drogas não sejam substrato desse transportador. Assim como também já foi relatado o inverso, ou seja, nem toda substância que estimula a expressão de um gene para transportador do tipo ABC será transportada por ele (SCHOONBEEK et al., 2002).

Atualmente estão em andamento novos experimentos em que a droga é adicionada ao micélio do fungo após ele estar crescido, e o mesmo é coletado para as análises de expressão gênica em intervalos de tempo menores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. M. S. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, BA, 2002. Tese (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANANTHARAMAN, V.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small - molecule – binding domains. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 1271 – 1292, 2001.

ANGERMAYR, K.; PARSON, W.; STÖFFLER, G. et al. Expression of atrC – encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans* – is sensitive to cycloheximide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1453, p. 304 – 310, 1999.

AZEVEDO, A. M. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 171 – 175, 2000.

AYAKI, H.; LEE, M. J.; SUMINO, K. et al. Different cytoprotective effect of antioxidants and change in the iron regulatory system in rodent cells exposed to paraquat or formaldehyde. **Toxicology**, v. 208, p. 73 – 79, 2005.

BONNEH-BARKAY, D.; REANY, S. H.; LANGSTON, W. J. et al. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. **Molecular Brain Research**, v. 134, p. 52 – 56, 2005.

BODÓ, A.; BAKOS, É.; SZERI, F. et al. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. **Toxicology Letters**, v. 140, p. 133 – 143, 2003.

BORST, P.; ZELCER, N.; HELVOORT, A. V. ABC transporters in lipid transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 1486, P. 128 – 144, 2000.

BORGES, M. I.; WALMSLEY, R. The structure and function of drug pumps. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p. 71 – 80, 2001.

BRENDEL, M.; KHAN, N.A.; HAYNES, R.H. Common steps in the repair of alkylation and radiation damage in yeast. **General Genetics**, v. 106, p. 289 – 295, 1970.

CAMPBELL, E. J.; SCHENK, P. M.; KAZAN, K. et al. Pathogen responsive expression of a putative ATP – binding cassette transporter gene conferring

resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1272 – 1284, 2003.

CEITA, G. DE O. Análise do processo de morte celular em *Theobroma cacao* induzido por *Crinipellis pernicioso*. Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

CHANG, G. Multidrug resistance ABC transporters. **FEBS Letters**, v. 555, p. 102 – 105, 2003.

CHANG, G. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. **Journal of Molecular Biology**, v. 330, p. 419 – 430, 2003.

COX, G. M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 173 – 180, 2003.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 1 – 13, 2005

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso* causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, p. 515 – 523, 1980.

FANG, G. C.; HANAU, R. M.; VAILLANCOURT, L. J. The *SOD2* gene, encoding a manganese – type superoxide dismutase, is up – regulated during conidiogenesis in the plant – pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 155 -165, 2002.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, v. 75, p. 552 – 556, 1991.

GRIFFITH, G. W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R. N.; HEDGER, J. N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, p. 423 – 435, 2003.

HENRIQUES, J. A. P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and characterization of psor mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 95, p. 273 – 288, 1980.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 205 – 210, 2001.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress responses**. 1 Ed. R. G. Landes Company, p. 178, 1997.

HOLLAND, I. B.; BLIGHT, M. A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, p. 381 – 399, 1999.

JASINSKI, M.; DUCOS, E.; MARTINOIA, E. et al. The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1169 – 1177, 2003.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, v. 22, p. 149 – 158, 2001.

LANDIS, G. N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of ageing and development**, v. 126, p. 365 – 379, 2005.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ATP transporters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 426 – 431, 2004.

MACÊDO, J. N. A. Caracterização Funcional do Indutor de Necrose de *Crinipellis pernicioso* em *Theobroma cacao* L. Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

MAMNUM, Y. M.; SCHÜLLER, C.; KUCHLER, K. Expression regulation of the yeast *PDR5* ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. **FEBS Letters**, v. 559, p. 111 – 117, 2004.

MARTCHENKO, M.; ALARCO, A.; HARCUS, D. et al. Superoxide dismutase in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal – induced *SOD5* gene. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 456 – 467, 2004.

MARIS, A. F.; KERN, L.; PICADA, J.N. et al. Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 37, p. 175 – 182, 2000.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 835 – 846, 2004.

ORCHAD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K. et al. Changes in morphology and measurement of cytokin levels during the development of witches-brooms on cocoa. **Plant Pathology**, v. 43, p. 65 – 72, 1994.

PEELMAN, F.; LABEUR, C.; VANLOO, B. et al. Characterization of the ABCA transporter subfamily: identification of prokaryotic and eukaryotic members, phylogeny and topology. **Journal Molecular Biology**, v. 325, p. 259 – 274, 2003.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K. et al. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 104, p. 65 – 72, 2000.

PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S.M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, v. 15, p. 743 – 752, 1996.

PUNGARTNIK, C.; KERN, M.; BRENDDEL, M. et al. Mutant allele *pso7-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for functional cytochrome c oxidase. **Current Genetics**, v. 36, p. 124 – 129, 1999.

QUENTIN, Y.; FICHANT, G.; DENIZOT, F. Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. **Journal Molecular Biology**, v. 287, p. 467 – 484, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**. 6 Ed. W. H. Freeman and Company, 1999.

ROHERS, V. M. R.; PERALBA, M. C. R.; HENRIQUES, J. A. P. et al. Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* *sod1Δsod2Δ* double mutants against oxidative damage. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, p. 1 -7, v. 36, 2003.

SAIER, M. H.; PAULSEN, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. **Cell & Developmental Biology**, v. 12, p. 205 – 213, 2001.

SCHÄFER, G.; KARDINAH, S. Iron superoxide dismutases: structure and function of an archaic enzyme. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1330 -1333, 2003.

SCHNEIDER, E.; HUNKE, S. ATP – binding – cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP – hydrolyzing subunits/domains. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 1 – 20, 1998.

SCHOONBEEK, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; DE WAARD, M. A. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 1165- 1172, 2002.

SLAVEN, J. W.; ANDERSON, M. J.; SANGLARD D. et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 199 – 206, 2002.

SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 1 – 15, 2000.

TABARES, L. C.; BITTEL, C.; CARRILLO, N. et al. The single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus* is a cambialistic, manganese-containing enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3223 – 3227, 2003.

TAKAHASHI, K.; KOHDA, K. H.; KAWAZOE, Y. Mutagenic potency of alkylated 4-Nitroquinoline 1-oxide: Its dependence on the rate of metabolic activation. **Chem. Pharm. Bull**, v. 31, p. 959 – 965, 1983.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. V. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227 – 1236, 2002

WHEELER, B. E. J.; MOORE, D.; CASSELTON, L. A. et al. The Growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. **Developmental Biology of Higher Fungi**, p. 103 – 116, 1985.

WHITTAKER, J. W. The irony of manganese superoxide dismutase. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1318 -1321, 2003.

YAMAMOTO, S.; HIRAGA, K.; ABIKO, A. et al. A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Communications**, v. 330, p. 622 – 628, 2005.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (*SOD1*), Mn-SOD (*SOD2*), and EC-SOD (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression. **Free radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 337 – 349, 2002.

ZWIERS L.; WAARD, M. A. Characterization of the ABC transporter genes MgAtr1 and MgAtr2 from the wheat pathogen *Mycosphaella graminicola*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 115 – 125, 2000.