UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de
Moniliophthora perniciosa (fungo da vassoura de bruxa) em
Saccharomyces cerevisiae.**

Gabriel Moretti de Almeida

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de
Moniliophthora perniciosa (fungo da vassoura de bruxa) em
Saccharomyces cerevisiae.**

Gabriel Moretti de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A447e	<p>Almeida, Gabriel Moretti de</p> <p>Estudo da função biológica da oxidase alternativa (AOX) de <i>Moniliophthora perniciosa</i> (fungo da vassoura de bruxa) em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / Gabriel Moretti de Almeida. -- São Paulo, 2014.</p> <p>80p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.</p> <p>Orientador: Souza, Gisele Monteiro de</p> <p>1. Fungo : Biotecnologia 2. Mitocôndrias I. T. II. Souza, Gisele Souza de, orientador.</p> <p>620. 8 CDD</p>
-------	--

Gabriel Moretti De Almeida

Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de
Moniliophthora perniciosa (fungo da vassoura de bruxa) em
Saccharomyces cerevisiae.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2014.

Dedico esta dissertação ao meu tio Carlos (*in memoriam*), que sempre me ensinou a correr atrás de meus sonhos e nunca desistir deles obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza, pelos ensinamentos, compreensão e amizade ao longo desses anos de convivência, me fazendo amar cada dia mais a Ciência e que, apesar das dificuldades, sempre me ajudou a manter o otimismo e a todos do laboratório, Lucas, Graziela, Íris e aos alunos novos.

Aos meus irmãos Lucas e Julia, que me ajudaram todos os dias com seu apoio e dedicação e a minha mãe Liana com sua sabedoria, cultura e carinho todos esses anos comigo.

À Viviane, pela sua paciência, amor, carinho e companheirismo nesses 5 anos de união, muito obrigado por me fazer bem e me fazer uma pessoa cada dia melhor.

Aos colegas de trabalho do laboratório da FCF e do laboratório do Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pela convivência e ajuda, em especial, Fernando Gomes pela ajuda na construção dos vetores e na execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer a ajuda da Prof.dra Alicia kowaltowski e seus dois alunos Bruno e Marcel pela ajuda com oxígrafo e a medição de peróxido de hidrogênio , e a atenção dada muito obrigado.

À FAPESP (bolsa processo 2011/05156-3 e Auxílio Jovem Pesquisador 2009/01303-1) e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

“O entusiasmo é a maior força da alma. Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas.”

Napoleão Bonaparte

Sumário

	Pág.
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	17
1.2. Importância econômica do cacauero	18
1.3. O fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> e a doença vassoura de bruxa	20
1.4. Tentativas de controle da doença	22
1.5. Alvos moleculares de <i>M. perniciosa</i> para o desenvolvimento de novos fármacos	26
1.6. Vias mitocondriais de transporte de elétrons	28
1.7. Balanço redox e espécies reativas de oxigênio	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. JUSTIFICATIVA	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Microrganismos e condições de cultura	37
4.2. Clonagem e expressão do gene Mp-AOX	38
4.3. Isolamento de mitocôndria de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.4. Análise do consumo de oxigênio	44

4.5. Experimentos de análise de crescimento	44
4.6. Medição de biomassa seca	45
4.7. Medição da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	45
4.8. Teste de viabilidade por diluição seriada	47
4.9. Medição de Glutathione (dosagem da razão GSH/GSSG)	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados.....39

TABELA 2: medição da GSH e GSSG.....69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos da doença vassoura de bruxa. (a) vassoura verde, (b) vassoura seca, (c) e (d) formação de basidiomata. Adaptado de THOMAZELLA et.al.. New Phytologist, 2012, com autorização dos autores..... 21

Figura 2: Esquema simplificado das etapas da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons.....29

Figura 3: Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons, incluindo as vias principal e alternativa. No processo de transporte de elétrons pela cadeia respiratória principal (complexos I,II,III E IV), ocorre a transferência dos elétrons provenientes dos cofatores reduzidos NADH e FADH₂ para os complexos respiratórios I e II, respectivamente. Ambos os complexos catalisam a redução da ubiquinona, que funciona como um mediador entre estes complexos iniciais e o complexo III. Os elétrons da ubiquinona são então transferidos para o complexo III e deste para o citocromo c. Ao final da cadeia respiratória o complexo IVd recebe os elétrons do citocromo c e catalisa a redução do oxigênio à água. Paralelamente a esta via, existem também enzimas alternativas como a oxidase alternativa (AOX), as NADH desidrogenases alternativas externas (Ext1 e Ext2) e a NADH desidrogenase alternativa interna (Int1). Essas enzimas desacoplam o transporte de elétrons da produção de ATP, pois não contribuem para formação do gradiente de prótons e, consequentemente, para geração de energia celular..... 30

Figura 4: Etapas da redução incompleta do oxigênio molecular O₂.....34

Figura 5: Esquema representativo do vetor pYES/2CT.....38

Figura 6: Teste de viabilidade por diluição seriada.....47

Figura 7.Foto do gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de (A) PCR referentes ao isolamento do gene *Mp-AOX* do vetor pGEM-T. (B) produtos de PCR do gene *Mp-AOX* usando diferentes clones do vetor pYES2/CT-*Mp-AOX*. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen)....51

Figura 8: Western blot da proteína *Mp-AOXp* de peso aproximado de 40kDA, marcada com anticorpo Anti-V5, revelada com fosfatase alcalina. Mitocôndria (MIT (AOX)), Citosol (Cito (AOX)), Mitocôndria (vetor vazio MIT Ø), Citosol (vetor vazio Cito Ø).....53

Figura 9: Gráfico representado a curva de crescimento na presença de diferentes fontes de carbono, glicose (verde e roxo), galactose (azul e vermelho) das linhagens transformadas. Representando a condição de inibição da expressão de *Mp-AOX*, células crescidas em glicose (verde e azul) e o vetor vazio (Azul e vermelho).Todas as curvas foram realizadas em meio mínimo SD-URA⁻, realizando a leitura da densidade óptica a cada 2 horas partindo da OD_{600nm} inicial de 0.2..... 55

Figura 10: Gráfico de barras representando a medição da biomassa seca em diferentes condições: glicose representando a inibição do promotor *GAL1* e galactose representando a ativação do promotor *GAL1*. Em azul a levedura transformada com o vetor vazio e em vermelho a levedura transformada com o vetor pYES2/CT+*Mp-AOX*. * e # Diferença estatisticamente significativa de acordo com teste *t student* pareado, com p<0.01.....56

Figura 11: Padrão de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas da linhagem de *S. cerevisiae* W303-1b-vetor vazio, sem expressar *Mp*-AOXp (A) e W303-1b+ *Mp*AOXp (B). NADH 2mM foi utilizado como substrato respiratório e ADP como substrato para o complexo enzimático ATP sintase. Após a inibição da cadeia respiratória principal pela antimicina A, o consumo de oxigênio foi analisado na presença de GMP (estimulador da AOXp) e do n-propil galato (inibidor da AOXp).
.....59

Figura 12: A formação de H₂O₂ mitocondrial foi monitorada durante a incubação das organelas isoladas de leveduras expressando *Mp*-AOX ou não, por 15 minutos a 30°C em tampão contendo 50µM de Amplex Red (Invitrogen), 0.5 U/ml de horderadish peroxidase (Sigma), 2% de etanol, 1 mM malato, 6mM glutamato e 100µg/ml de proteína mitocondrial. A produção de peróxido de hidrogênio foi medida por espectrofluorímetro, F-2500 FL Spectrophotometer- com excitação a 563nm e emissão a 587 nm (BUSSO et al., 2010).
..... 62

Figura 13: Teste de viabilidade das leveduras expressando ou não *Mp*-AOXp na presença dos principais bloqueadores azoxistrobina (complexo III) e SHAM (AOX). DMSO foi utilizado como solvente e, portanto, utilizado como controle (A). As células foram crescidas em meio SD-URA⁻ a 30°C até a fase LOG a partir de uma OD_{600nm} de 0.2, 5uL de cada diluição seriada de 5X foram aplicados em placa de SD-URA⁻ contendo 1,5% DMSO, 1mg/L azoxistrobina, 0,75g/L SHAM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.
.....65

Figura 14: Teste de viabilidade das leveduras expressando ou não *Mp*-AOXp na presença dos principais bloqueadores antimicina A (complexo III) e SHAM (AOX). DMSO foi utilizado como solvente e, portanto, utilizado como controle (A). As células foram crescidas em meio SD-URA⁻ a 30°C até a fase LOG a partir de uma OD_{600nm} de 0.2, 5uL de cada diluição seriada de 5X foram aplicados em placa de SD-URA⁻ contendo 1,5% DMSO, 1mg/L antimicina A, 0,75g/L SHAM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.
.....67

SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS

ADP -adenosina-5'-difosfato

AOX- gene que codifica “*alternative oxidase*”/ *oxidase alternativa*

AOXp – proteína oxidase alternativa

ATP- adenosina-5'-trifosfato

AZOXI- azoxistrobina

DMSO- Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

EDTA- ácido etileno diamino tetracético

HEPES- [N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]

Mp-AOX-“*Moniliophthora perniciosa alternative oxidase gene*”

Mp-AOXp – proteína oxidase alternativa de *Moniliophthora perniciosa*

NAD⁺ -nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)

NADH -nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)

NADP⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

OD_{600nm} – densidade ótica em 600 nanômetros

ORF – open reading frame (quadro de leitura aberto)

P_i -fosfato inorgânico

PCR- polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

SHAM -ácido salicilhidroxâmico

ROS -espécies reativas de oxigênio

SDS- dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE -eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS

Suc- Succinato

ton. - tonelada

RESUMO

Moretti-Almeida, G. Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae*. 80p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

Moniliophthora perniciosa é um fungo basidiomiceto causador da doença vassoura de bruxa do cacau. Um conjunto de técnicas para controle da doença vem sendo testado e aplicado, incluindo o uso de fungicidas a base de inibidores da cadeia respiratória principal, específicos para fungos. No entanto, *M. perniciosa* tem se mostrado resistente a estas drogas e uma possível explicação para tal resistência é a atividade de uma oxidase alternativa (AOXp), cuja expressão e atividade já vêm sendo caracterizadas. A análise funcional deste gene de *M. perniciosa* não foi realizada, pois uma técnica efetiva para produção de mutantes do fungo ainda não foi estabelecida. Assim, este projeto visou testar a hipótese de que a expressão do gene AOX de *M. perniciosa* (*Mp-AOX*) previne o estresse oxidativo devido à diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela cadeia respiratória. Para isso realizamos a caracterização do gene *Mp-AOX* por clonagem e expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*. O vetor de expressão em levedura pYES2/CT com o gene *Mp-AOX* foi montado e a linhagem de levedura W303-1b transformada. Foram realizadas análises de medição de formação de massa celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial, testes de viabilidade na presença de inibidores da cadeia respiratória principal Antimicina A e azoxistrobina e do inibidor específico de AOXp - ácido salicílico hidroxâmico (SHAM). Nossos resultados indicam que quando o gene *Mp-AOX* é expresso em *S. cerevisiae* há diminuição da geração de biomassa celular, menor proliferação celular e decaimento na produção de ROS, sugerindo que nossa hipótese inicial de que *Mp-AOXp* causa alívio no estresse oxidativo estar correta. A levedura recombinante expressando o gene *Mp-AOX* mostrou-se viável para utilização como modelo para estudos de novos análogos químicos para o combate da vassoura de bruxa, auxiliando a agricultura e promovendo novos entendimentos para o combate desse fungo.

Palavras-chave: estresse oxidativo, *S. cerevisiae*, oxidase alternativa, mitocôndria, vassoura de bruxa.

ABSTRACT

Moretti-Almeida, G. **Study of the biological function of the Alternative Oxidase (AOX) from *Moniliophthora pernicious* (witches' broom fungus) in *Saccharomyces cerevisiae***. 80p. Thesis (Master) - Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

Moniliophthora pernicious is a basidiomycete fungus that causes witches' broom of cacao disease. A number of techniques for disease control has been applied and tested, including the use of the fungicides that inhibits the main respiratory chain, specific to fungi. However, *M. pernicious* has proven to be resistant to these drugs and one possible explanation to this resistance would be the activity of an alternative oxidase activity (AOXp), whose expression and activity have already been characterized. Functional analysis of this gene in *M. pernicious* was not performed because an effective technique for producing mutants of the fungus has not yet been established. This project aimed to test the hypothesis that the expression of *Mp*-AOX gene prevents oxidative stress due to decreased production of reactive oxygen species (ROS) by the respiratory chain. To perform this characterization, *Mp*-AOX gene was cloned and heterologous expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The yeast expression vector pYES2/CT with *Mp*-AOX gene was constructed and the yeast strain W303 - 1b transformed. Analyses measuring cell mass formation, generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), viability tests challenging the cells against inhibitors of the main respiratory chain, Antimycin A and azoxystrobin, and against the specific inhibitor of the AOXp - salicylaldehyde hydroxamic acid (SHAM) were performed. Our results indicate that the *Mp*-AOX gene expression in *S. cerevisiae* causes decreased generation of cellular biomass, less cell proliferation and the decay in the production of ROS, suggesting that our initial hypothesis that *Mp*-AOXp relieves the oxidative stress is correct. The recombinant yeast expressing *Mp*-AOX gene was feasible for use as a model for studies of new chemical to fight witches' broom, helping with agriculture and promoting new understandings to combat this fungus.

Keywords: oxidative stress, *S. cerevisiae*, alternative oxidase, mitochondria, witch's broom.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

A contribuição para a comunidade científica da utilização da *S. cerevisiae* como organismo modelo tem trazido importantes resultados, graças às informações obtidas pela conservação evolutiva dos genes e proteínas e a sua funcionalidade nos organismos. Em 1988 foram utilizados métodos para a introdução de mutações no genoma da levedura, para que se tornasse particularmente fácil de estudar, não só a função bioquímica dos produtos gênicos, mas também as consequências biológicas da insuficiência desses genes. Após a publicação da sequência genômica da levedura, a comunidade científica organizou um esforço cooperativo para produzir um conjunto quase completo de deleções de cada quadro aberto de leitura - ORF (*Open Reading Frames-ORF*) (WINZELER *et al.*, 2011; GIAEVER *et al.*, 2002).

Em 1996, o “*Saccharomyces Genome Project*” revelou a presença de mais de 6000 ORFs no genoma da *S. cerevisiae*, a maioria das quais codificam proteínas específicas. Desses, cerca de 1000 genes (aproximadamente 17%) são membros de famílias gênicas associadas à ortólogos humanos. Para a maioria destes genes seu homólogo de mamífero é funcional na levedura e complementa a função no mutante deletado da levedura (HEINICKE *et al.*, 2007).

A comparação das sequências genômicas da levedura com os de outros organismos, incluindo o humano, levou à constatação de que tanto as sequências de aminoácidos das proteínas como suas funções, têm sido

conservadas. Sendo assim, anotações de funções biológicas em organismos eucariotos inferiores podem ser, freqüentemente, transferíveis de uma espécie para a outra. Isso facilitou os estudos de organismos complexos (como o humano) e de difícil cultivo ou manipulação genética devido à robustez e facilidade de manipulação do genoma da *S. cerevisiae* (STRATHERN *et al.*, 1981; BROACH *et al.*, 1991).

Devido ao fato de ser um organismo de fácil cultivo, de baixo custo e crescimento rápido (muitas vezes podendo-se obter respostas apenas modulando o meio de cultivo), diversos trabalhos têm sido feitos utilizando *S. cerevisiae* para caracterizar seus aproximadamente 6000 genes. Por ser um organismo eucarioto unicelular e com um genoma de pequeno tamanho em relação à maioria dos eucariotos superiores – além de existirem diversas técnicas de manipulação genética e metabólicas bem estabelecidas –, há uma facilidade muito maior para a caracterização de vias metabólicas e respostas a estresse e drogas em geral nesse organismo (BOTSTEIN & FINK, 2011).

1.2. Importância econômica do cacauero.

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta nativa da Amazônia, sendo uma espécie arbórea que tem como principal produto comercial suas amêndoas, as quais são utilizadas como matéria-prima do chocolate (SANTOS, 2005).

O cacauero é uma planta de clima tropical, pertence à família das Esterculiáceas. É encontrada nas Américas, tanto nas terras baixas – dentro dos bosques escuros e úmidos sob a proteção de grandes árvores – como em florestas menos exuberantes e menos úmidas (PURDY, 1996).

O cacau se adapta bem em regiões com temperaturas médias superiores a 21 °C. Tolerar, por curto espaço de tempo, temperaturas mínimas próximas a 7° C, porém, podem ocorrer algumas mudanças na composição da gordura das sementes, resultando em um produto final de qualidade inferior. As colheitas têm início a partir do 4º ano, e são feitas em dois períodos: safra (novembro a fevereiro) e temporão (abril a agosto). Geralmente, a maior produtividade acontece a partir do 7º ano (FIORAVANTI, C. A 2006).

Em meados do século 20, as maiores regiões produtoras de cacau do mundo eram o litoral do Equador e o estado da Bahia no Brasil (WOOD & LASS, 1985), especialmente na década de 70 estas regiões foram as principais fontes geradoras. Nesta época, cerca de 90% da produção cacauífera era destinada à exportação, e deste total 80% era produzido na Bahia (BASTOS, 1987). O Brasil já chegou a produzir 400.000 toneladas/ano de amêndoas de cacau no início da década de 80, alcançando hoje essa produção algo em torno de 150.000 ton. Esse volume é bem inferior ao necessário para a indústria nacional, que consome ao redor de 250.000 ton., obrigando essa a importar amêndoas de outros países como a Indonésia, os quais produzem cacau de baixa qualidade (CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 2012).

A partir de 1989 ocorreu um decaimento na produção do cacau, devido ao surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* que é responsável pela doença conhecida como vassoura de bruxa do cacaueiro (PEREIRA et al., 1989). A produção baiana foi reduzida em cerca de 50% no ano de 2000 (FAO, 2002), retirando o Brasil do grupo dos países exportadores de cacau e trazendo, para as regiões produtoras, complexos problemas de

caráter social, econômico e ecológico (BASTOS, 1988; ANDEBRHAN et al.,1999).

Isso mostra as consequências que patógenos não controlados podem exercer na produção de frutos de cacau. Um grande esforço já foi realizado para entender o fungo *M. pernicioso* e sua interação com o cacaueiro (*Theobroma cacao*) através do projeto genoma da vassoura de bruxa (ALBUQUERQUE, P.S.B et al; 2005).

Apesar dos principais países produtores de cacau localizarem-se na região tropical do globo, o cacau é um produto de importância para as indústrias chocolateiras de todo o mundo. O consumo mundial de amêndoas de cacau é de mais de três milhões de toneladas anuais e estima-se que as indústrias movimentem cerca de 60 milhões de dólares anualmente. O oeste da África supre a maior parte desta demanda mundial, destacando-se como principais produtores de cacau a Costa do Marfim, Gana e Camarões (Organização Internacional do Cacau - ICCO 2009, sigla em inglês). Atualmente, o Brasil responde por menos de 5% da produção mundial de cacau.

1.3. O fungo *Moniliophthora pernicioso* e a doença vassoura de bruxa

A vassoura de bruxa foi observada inicialmente em 1700, mas cientificamente investigada pela sua devastação em lavouras de cacau pelo pesquisador Gregor Stahel em 1890, que isolou e nomeou o fungo causador - *Marasmius pernicioso*. A vassoura de bruxa já foi detectada na Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trindade e Tobago (1939), Granada (1948), Brasil (Bahia e região da bacia amazônica) (1989) e no Panamá (1989)

(PURDY; SHIMIDT,1996). Países produtores de cacau como América do Sul e das Ilhas do Caribe são as principais regiões afetadas pela Vassoura de bruxa (EVANS 1980; PRUDY et al. 1996).

Trata-se de uma fitopatologia de difícil controle devido a transição de ciclos de vida do fungo causador. Outro fator preocupante, é que o genoma do fungo causador da vassoura de bruxa possui grande homologia a outro patógeno que acomete o cacau, *Moniliophthora roreri* também patógeno hemibiotrófico, causador da doença *Frosty pod rot* (FPR, Monilíase). O fungo causador da vassoura de bruxa é de fácil visualização; após infectar as plântulas de cacau e em suas transições (ciclos de vida) no cacaueiro. A figura 1 representa imagens de sua fitopatologia.

Vassoura verde (primeira fase da doença)

Vassoura seca (Segunda fase da doença).

Formação de cogumelos ou basidiomata (proliferação do micélio sobre os tecidos necrosados)

Figura 1: Ciclos da doença vassoura de bruxa. (a) vassoura verde, (b) vassoura seca, (c) e (d) formação de basidiomata. Adaptado de THOMAZELLA et.al.. New Phytologist, 2012, com autorização dos autores.

A doença vassoura de bruxa apresenta duas fases distintas: uma biotrófico / parasitária e uma fase necrotrófico / saprotrófica. Na fase biotrófica, o fungo apresenta micélio intercelular monocariótico, o que provoca hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, perda da dominância apical, e proliferação de gemas axilares, resultando na formação anormal de caules, chamado vassouras verdes. Na segunda fase, o fungo passa para a fase saprotrófica, com a propagação do micélio dicariótico intracelular, concomitante com necrose e morte dos tecidos infectados, distal ao local da infecção original. Esta etapa resulta na formação da vassoura seca (EVANS, 1980; CEITA et al., 2007).

A principal forma de disseminação da doença é pelo ar, embora as chuvas não deixem de exercer também papel importante (EVANS, 1980; ANDEBHRAN, 1988). Após a infecção dos tecidos susceptíveis, principalmente os meristemáticos (CRONSHAW & EVANS, 1978), observa-se a formação de brotos hipertrofiados, com internódios mais curtos, e excessiva proliferação de gemas laterais, comumente denominadas de vassouras verdes (EVANS, 1980). O período em que as vassouras permanecem nesta fase é variável, em média entre cinco e doze semanas, dependendo do vigor da planta e da variedade do fungo (WHEELER & MEPSTED 1982; BAKER & HOLLIDAY, 1957; SOLORZANO, 1977).

1.4. Tentativas de controle da doença.

Indiscutivelmente, a melhor estratégia para controle da doença em longo prazo seria o plantio de cultivares resistentes ou tolerantes. Não obstante, cultivares exibindo resistência ou tolerância ainda são raras ou inexistentes.

Porém, no Equador demonstrou-se que variedades resistentes podem tornar-se susceptíveis ao longo de várias gerações e um estudo (CEPLAC 2012) recente demonstrou que há uma baixa variação genética do cacauieiro na Bahia quando comparada àquela encontrada na região Amazônica, mostrando apenas a existência de dois genótipos. Estes resultados indicam que estes clones resistentes podem ser muito sensíveis a novas introduções do fungo advindas de outras partes do mundo (EVANS, 1980).

Em vista disso, foi iniciado em 2000, o Projeto Genoma Vassoura de bruxa. Os resultados obtidos a partir do conjunto de dados gerados após o sequenciamento do genoma do patógeno vêm trazendo contribuições importantes para o desenvolvimento de estratégias de combate à doença como também têm permitido o esclarecimento científico de estratégias de manejo que já vem sendo utilizadas, permitindo assim que as mesmas sejam melhoradas.

Além do impacto econômico causado pela Vassoura de bruxa, existem outros danos decorrentes desta crise, visto que a cacauicultura é importante para geração de novos empregos diretos e indiretos na região sul da Bahia. Mesmo sendo evidente a importância socioeconômica, há escassez em recursos que possam ser utilizados para o combate da doença. Tentativas a serem utilizadas seriam a poda fitossanitária, o controle biológico, o desenvolvimento de variedades de cacau e o uso de fungicidas (como descrito pela CEPLAC, 2009; DIAS L.A.S. 2001).

A poda fitossanitária consiste na remoção das partes infectadas da planta para assim interromper o ciclo da doença diminuindo o inóculo (LIMA et al., 1991). O controle biológico se utiliza de fungicidas biológicos como, por

exemplo, o TRICONOVAN que possui fungos *Trichoderma* que são capazes de inibir a esporulação de *M. perniciosa*, reduzindo as taxas de infecção (BASTOS & J. DIAS 1992).

Embora essas propostas pareçam eficazes no combate da vassoura de bruxa, as mesmas não são suficientes para a eliminação do patógeno. Os fungicidas mais recomendados para o controle da vassoura de bruxa seriam o Folicur (Bayer) e o Cobre Sandoz BR. O folicur pertence ao grupo químico dos triazóis e atua na síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo. O Cobre Sandoz BR é um fungicida a base de cobre, cuja ação tóxica sobre *M. perniciosa* não é ainda suficientemente conhecida (THOMAZELLA, D.P.T. et al 2012).

Existem drogas com ação antifúngica à base de estrobilurinas sintéticas ou azoxistrobinas, fungicidas que atuam na quinona oxidase. Porém, as estrobilurinas são a principal classe de fungicidas utilizada para o controle de pragas na agricultura em geral. Estes químicos citados inibem a cadeia respiratória mitocondrial através da ligação específica ao centro Qo do citocromo bc1 (complexo III) (ANKE, 1995).

O surgimento dos fungicidas sistêmicos, principalmente daqueles com atividade contra fungos da classe dos basidiomicetos, criou novas perspectivas para o controle da vassoura de bruxa, não só em frutos, como também em lançamentos foliares e almofadas florais. Os primeiros a mostrar atividade *in vivo* pertencem ao grupo dos triazóis. Os fungicidas do grupo dos triazóis têm se destacado não só em ensaios de laboratório e casa de vegetação, como também, e principalmente, em condições de campo. O fungicida tebuconazol foi o que mostrou os melhores resultados em uma série de experimentos

realizados na região cacaujeira da Bahia, dados estes que motivaram sua recomendação no controle da vassoura de bruxa tanto em viveiros quanto em campo. As estrobilurinas são um grupo de antifúngicos que também tem mostrado bons resultados, com destaque para a azoxistrobina; que apresenta um controle efetivo em almofadas florais e lançamentos foliares, mas pouca efetividade em frutos infectados (OLIVEIRA, LUZ, 2005).

Em adição ao uso de fungicidas, o conhecimento do genoma da *M. perniciosa*, pode ser uma poderosa ferramenta a ser utilizada contra essa doença. Devido à importância ambiental e econômica da doença vassoura de bruxa, estudos recentes têm sido desenvolvidos, a fim de compreender os mecanismos desse patógeno com o programa de estudos genômicos de *M. perniciosa*, assim como o do cacau durante a infecção pelo patógeno (GESTEIRA ET AL., 2007; CEITA ET AL., 2007; GARCIA ET AL., 2007; MONDEGO ET AL., 2008). No ano 2000 foi iniciado o Projeto Genoma Vassoura de bruxa (WBD), desenvolvido junto às universidades e instituições: o LGE (Laboratório de Genômica e Expressão) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), a UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz), a UFBA (Universidade Federal da Bahia), a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira), a CENARGEN-EMBRAPA e a UEFS (Universidade Estadual de Feira de Santana). Esse projeto tem permitido a elucidação de importantes mecanismos desse patógeno relacionados na relação planta-patógeno.

Desde 2000, quando o projeto WBD genoma foi iniciado (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), vários artigos foram publicados visando o entendimento da patogenicidade e mecanismos do desenvolvimento

de *M. pernicioso*. Por exemplo, uma caracterização bioquímica da interação entre cacau e *M. pernicioso* revelou alterações metabólicas em plantas infectadas, incluindo o aumento do malonaldeído, conteúdo de glicerol e produção de etileno e oxalato, um fator que poderia limpar íons de cálcio que se ligam a polímeros de pectina, tornando paredes das células vegetais mais acessíveis às pectinases fúngicas (SCARPARI et al., 2005;. RICONES et al., 2008).

1.5 Alvos moleculares de *M. pernicioso* para o desenvolvimento de novos fármacos.

A atuação de drogas sobre fungos envolve os seguintes locais de ação: a) Síntese da parede celular; b) Alteração da membrana plasmática; c) Síntese do ergosterol; d) Divisão celular; e) Síntese de ácidos nucleicos; f) Síntese proteica; g) Inibidores metabólicos (REANKAR, GRAYBILL, 2003).

Como descrito por MONDEGO et al. 2008, as primeiras análises do genoma de *M. pernicioso* foram publicadas com ênfase nos genes potencialmente envolvidos com o desenvolvimento da doença, como as citocromo P450 monooxigenases, elementos transponíveis, prováveis ativadores de defesa, efetores de patogenicidade, enzimas de degradação de parede celular vegetal, proteínas relacionadas à metilotrofia e biossíntese de hormônios vegetais pelo fungo. A identificação destes genes permitiu a formulação de hipóteses referentes a processos e mecanismos relacionados à patogenicidade deste fungo, bem como ao desenvolvimento da doença.

A análise de bibliotecas de ESTs (do inglês *expressed sequence tags*) e de microarranjos de DNA mostrou diferenças interessantes na expressão de

determinados genes entre os estágios biotrófico e necrotrófico de *M. perniciosa*. Em sua fase biotrófica, o fungo aparentemente encontra-se em grande atividade metabólica, mas esta atividade não é direcionada para o crescimento celular, mas sim para a síntese de metabólitos secundários e proteínas envolvidas na sobrevivência e interação com o cacaueteiro (RINCONES et al. 2008). Um desses genes diferencialmente expressos é homólogo aos codificantes para a enzima oxidase alternativa (AOX). THOMAZELLA e colaboradores demonstraram que o gene *Mp-AOX* tem sua expressão consideravelmente aumentada na fase biotrófica (fase infectiva) do patógeno (THOMAZELLA et al., 2012).

Especula-se que a patogenicidade de *M. perniciosa* esteja relacionada à atividade da enzima *Mp-AOXp*, assim como à resistência do patógeno aos fungicidas que atuam inibindo a cadeia respiratória principal. Neste contexto, as diferenças encontradas entre os testes *in vitro* e em campo poderiam ser explicadas pela expressão diferencial do gene *Mp-AOX* nas diferentes fases de desenvolvimento do fungo. Isso porque os experimentos *in vitro* foram realizados com o patógeno na fase saprotrófica, enquanto que em campo o fungo encontra-se em diversos estágios de desenvolvimento (fases biotrófica e saprotrófica). A fase biotrófica é supostamente mais resistente à ação dos fungicidas e pode ser responsável pela ineficácia destas drogas em campo. Além disso, a expressão diferencial do mRNA de *Mp-AOX* sugere que a enzima pode ser particularmente importante no início do processo de infecção (fase biotrófica do fungo), atuando como um possível mecanismo de resistência do patógeno às moléculas de defesa da planta. Dentre estas moléculas está o óxido nítrico, um potente inibidor do complexo IV da via respiratória principal,

sendo a *Mp-AOXp* insensível a ação do mesmo. De fato, experimentos de expressão gênica (qPCR – quantitative PCR) realizados com *M. perniciososa* mostraram um aumento de expressão do gene *Mp-AOX* após a incubação do micélio saprotrófico do fungo com um doador de óxido nítrico (NOC-5), reforçando essa hipótese (THOMAZELLA et al., 2012).

1.6. Vias mitocondriais de transporte de elétrons

As mitocôndrias são organelas intracitoplasmáticas envoltas por duas membranas e estão presentes em quase todas as células eucariontes. A principal função atribuída à mitocôndria é a de prover energia à célula. Estima-se que mais de 90% do ATP necessário aos diversos propósitos biológicos seja produzido por essa organela. Além disso, está também envolvida com a biossíntese de pirimidinas e do grupo heme, bem como com o metabolismo de colesterol e de neurotransmissores. Têm ainda funções na produção de ROS (em processos de sinalização celular e inflamatório) e na detoxificação dessas mesmas espécies em situações de estresse (Barros e Nóbrega, 1999). Estruturalmente, a membrana interna (MI) existe como segmentos em justaposição a membrana externa (ME), bem como segmentos que invaginam no compartimento interno chamado de matriz. As invaginações, denominadas cristas, são dobradas em lamelas ou estruturas tubulares para aumentar a área de superfície da MI (ATKINSON & WINGE, 2009).

Durante a respiração, a transferência de elétrons da molécula de carbono inicial até o oxigênio é indireta e complexa, envolvendo a redução das coenzimas NAD⁺ e FAD em reações da glicólise e do ciclo de Krebs. Os elétrons associados às coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) são

subsequentemente transferidos para a cadeia de transporte de elétrons, onde uma série de reações de oxidação e redução ocorre de maneira sequencial. A energia gerada pelo fluxo de elétrons nesta cadeia é utilizada para a translocação de íons hidrogênio da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Finalmente, a energia armazenada nesse gradiente de prótons (força próton motriz) é utilizada para a síntese de ATP (figura 2).

Figura 2: Esquema simplificado das etapas da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons.

Em mamíferos, a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas para a molécula de oxigênio ocorre através de complexos respiratórios multi-protêicos em uma via linear de transporte de elétrons denominada cadeia respiratória principal. No entanto, em plantas e muitos fungos este sistema é mais complexo e variável, envolvendo centros *redox* alternativos, como as enzimas NAD desidrogenases alternativas (externas e/ou internas) e oxidase alternativa (AOX) (JOSEPH-HORNE, HOLLOMON & WOOD 2001) (figura 3).

Figura 3: Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons, incluindo as vias principal e alternativa. No processo de transporte de elétrons pela cadeia respiratória principal (complexos I, II, III e IV), ocorre a transferência dos elétrons provenientes dos cofatores reduzidos NADH e FADH_2 para os complexos respiratórios I e II, respectivamente. Ambos os complexos catalisam a redução da ubiquinona, que funciona como um mediador entre estes complexos iniciais e o complexo III. Os elétrons da ubiquinona são então transferidos para o complexo III e deste para o citocromo c. Ao final da cadeia respiratória o complexo IV recebe os elétrons do citocromo c e catalisa a redução do oxigênio à água. Paralelamente a esta via, existem também enzimas alternativas como a oxidase alternativa (AOX), as NADH desidrogenases alternativas externas (Ext1 e Ext2) e a NADH desidrogenase alternativa interna (Int1). Essas enzimas desacoplam o transporte de elétrons da produção de ATP, pois não contribuem para formação do gradiente de prótons e, conseqüentemente, para geração de energia celular.

O papel da oxidase alternativa na cadeia respiratória de fungos fitopatógenos, envolve, além dos complexos básicos da via principal, ramificações na cadeia clássica, que constituem as vias alternativas de transporte de elétrons (figura 3). A existência destas vias é decorrente da presença de enzimas capazes de catalisar as mesmas reações de alguns dos complexos respiratórios mitocondriais. Dentre estas enzimas destacam-se as NADH desidrogenase alternativas (externas e internas) e a oxidase alternativa (AOXp). As NADH desidrogenase alternativas catalisam a mesma reação catalisada pelo complexo I que compreende a oxidação do NADH a NAD^+

(ELHAFEZ et al. 2006). Já a AOXp atua em paralelo com os complexos III e IV da via principal, realizando a oxidação do ubiquinol e catalisando a redução dos quatro elétrons do dioxigênio (O_2) para água (H_2O) (JOSEPH-HORNE et al. 2001; SLUSE & JARMUSZKIEWICZ 1998). A AOXp localiza-se na região matricial da membrana interna da mitocôndria e o transporte de elétrons realizado por esta via não é acoplado a translocação de prótons para o espaço intermembranas mitocondrial e assim a energia que seria utilizada para produção de ATP é dissipada.

Em tecidos florais específicos de plantas termogênicas, a atividade da AOXp é consideravelmente alta, pois nestes tecidos necessita-se da geração de calor para volatilização dos compostos que atraem insetos polinizadores (MEEUSE 1975; WATLING et al. 2006). Nos demais organismos, a real função da AOXp é bastante discutida, devido ao fato da sua atividade influenciar de forma mínima na formação do gradiente de prótons, necessário para a síntese de ATP (JOSEPH-HORNE et al., 2001). Evidências sugerem que ela pode estar envolvida na adaptação dos organismos a flutuações ambientais, incluindo estresse oxidativo, frio e alterações das fontes de carbono (TUDELLA et al., 2004). Nestas condições, a oxidase alternativa possivelmente permite o contínuo *turnover* de esqueletos carbônicos pelo Ciclo de Krebs bem como a reoxidação de coenzimas (regeneração de NAD^+), sendo fundamental no controle do balanço redox da célula (AFFOURTIT et al., 2002; MILLENAAR & LAMBERS, 2003; STENMARK & NORDLUND, 2003). Adicionalmente, situações que levam a uma total inibição da cadeia respiratória principal e resultam em um desbalanço da razão de ubiquinona reduzida/ubiquinona oxidada também requerem a atividade da AOXp. De fato, no organismo

Aspergillus fumigatus, importante patógeno humano, demonstrou-se que a AOXp é capaz de minimizar os danos causados pelo óxido nítrico (importante inibidor do complexo IV da via principal) que é gerado pelos macrófagos alveolares. No trabalho realizado por Magnani e colaboradores (2009), um mutante *knock-down* para o gene AOX de *A. fumigatus* foi obtido. A viabilidade dos conídios produzidos por esta linhagem mutante diminuiu consideravelmente em relação ao selvagem, bem como a sobrevivência dos mesmos durante a infecção do hospedeiro, mostrando assim o importante papel da AOXp para a patogenicidade do fungo (MAGNANI et al., 2009).

Outras funções atribuídas a essa proteína incluem seqüestro do excesso de O₂ (GOMES et al., 2001; GASSNER & LIPPARD, 1999 ;BROADWATER et al., 1998), resistência a metais e toxinas (CASTRO-GUERRERO et al., 2008; MCDONALD & VANLERBERGHE, 2006; GRIESHABER & VOLKEL, 1998) e participação na reprogramação do metabolismo celular (CLIFTON et al., 2006).

O interesse pela AOXp se estendeu aos fungos quando, próximo do ano 2000, a cadeia respiratória se tornou um possível alvo dos agrotóxicos (JOSEPH-HORNE et al., 2001). Entre os fungicidas químicos empregados nas lavouras para combate de muitos fitopatógenos estão as drogas à base de inibidores da cadeia respiratória principal e sua toxicidade está relacionada à desestabilização da produção de ATP e ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, os organismos que possuem a oxidase alternativa ativa possuem a capacidade de continuar a produzir uma pequena quantidade de ATP mesmo na presença de inibidores da via principal como antimicina A e estrobilurina (ex: AMISTAR[®]). A seletividade das estrobilurinas parece estar baseada nas diferenças estruturais de membranas celulares que

refletem na penetração e degradação diferencial de fungos, vegetais e animais e não sobre as diferenças de sítios mitocondriais dos organismos alvos (VENÂNCIO et al., 1999; SMITH, 2002). As estrobilurinas são drogas específicas para fungos usadas até mesmo na constituição de muitos fungicidas (F500 – BASF – e o Amystar – Bayer) (BARTLETT et al. 2002).

Outra evidência da importante atuação da enzima oxidase alternativa na fase biotrófica de *M. perniciosus* é mostrada pela sensibilidade do micélio biotrófico ao SHAM (ácido salicilhidroxâmico), um conhecido inibidor da oxidase alternativa. O crescimento da fase biotrófica do fungo na presença deste inibidor resultou na inibição do crescimento do micélio tanto em meio rico como em meio pobre MYEA- *malt yeast extract agar* (extrato malte 20g/L, extrato de levedura 5g/L, ágar 20g/L) (THOMAZELLA et al., 2012). No entanto, apesar do crescimento prejudicado do micélio necrotrófico em meio pobre, este é capaz de claramente resistir à ação da droga em meio rico.

É interessante ressaltar que no caso específico da levedura *S. cerevisiae* não há cópia endógena de nenhum homólogo do gene *AOX* no genoma, o que facilita a utilização desse organismo como modelo para estudo funcional heterólogo da enzima oxidase alternativa.

1.7. Balanço redox e espécies reativas de oxigênio

A redução incompleta do O_2 na respiração aeróbia (figura 4) resulta na formação das chamadas Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), que podem ser altamente reativas e causar lesões oxidativas em várias

estruturas celulares como membranas, ácidos nucleicos e peptídeos. O estado redox de uma célula depende do grau de oxidação de suas biomoléculas. Os antioxidantes moleculares encontrados no meio intracelular, em estado reduzido, ajudam a prevenir o dano oxidativo (HALLWELL & GUTTERIDGE, 2007). Dados da literatura (HALLWELL, 1993., GILBERT, 1990) indicam que ocorrem desbalanços redox-localizados e específicos, relacionados intimamente com cada processo celular fisiológico ou patogênico. De acordo com essa hipótese, seria possível o acúmulo de lesões oxidativas ao longo do tempo, levando às patologias crônicas relacionadas com esse tipo de estresse (JONES, 2006).

Figura 4: Etapas da redução incompleta do oxigênio molecular O_2 .

Para evitar o acúmulo das ROS, as plantas possuem sistemas de defesa antioxidante eficientes, enzimáticos e não-enzimáticos, que permitem a eliminação dessas espécies reativas e a proteção contra os danos oxidativos (HERNÁNDEZ et al., 2001). As defesas não enzimáticas incluem as vitaminas C e E, glutathione (GSH), β -caroteno, compostos fenólicos, tocoferóis e poliaminas. Já o sistema defensivo enzimático, envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidases (PRX), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GSTs) (BLOKHINA et al., 2003; SCANDALIOS, 2005).

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a transformação da linhagem W303-1b de *S. cerevisiae* com o gene *Mp-AOX*, visando a caracterização das alterações bioquímicas relacionadas à expressão heteróloga deste gene em um sistema biológico.

2.2. Objetivos específicos

Dentre os principais objetivos específicos, destacam-se:

- A) Clonagem e expressão do gene *Mp-AOX* em *S. cerevisiae*;
- B) Análise da taxa de crescimento e obtenção de biomassa das leveduras transformadas em relação às selvagens;
- C) Caracterização do padrão de consumo de oxigênio e participação das vias de transporte de elétrons principal e alternativa nas leveduras selvagem e transformada;
- D) Comparação da produção de peróxido de hidrogênio nas linhagens transformada e selvagem de *S. cerevisiae*.

3 JUSTIFICATIVA

THOMAZELLA, et. al (2012) em seus estudos observaram os efeitos da inibição das vias respiratórias principal e alternativa no desenvolvimento *in vitro* dos micélios biotrófico e necrotrófico, utilizando como inibidores das vias respiratórias mitocondriais a azoxistrobina (inibidor da via principal) e o SHAM (inibidor da *Mp-AOXp*). Porém, “A fórmula é altamente instável e se degrada com facilidade e isso inviabiliza o uso no campo” (comunicação pessoal Prof. Dr. Gonçalo A.G. Pereira).

Verificou-se que apenas em conjunto esses dois fungicidas conseguem impedir o crescimento de *M. perniciosa*, o que sugere uma importante função da *Mp-AOXp* na resistência desse fitopatógeno à azoxistrobina. Este estudo se justifica pela importância econômica da cacauicultura para o Brasil e os impactos ocasionados pelo fungo *M. perniciosa* em nossa economia, sendo responsável por perdas anuais de produção de 20% até 90%, em casos mais severos (DIAS L.A.S. 2001).

Sabendo-se da dificuldade no controle da vassoura de bruxa, torna-se de suma importância desenvolver novas estratégias e buscar meios para desenvolver mecanismos que ajudem a desenvolver novos fármacos. Como o cultivo deste fungo é de difícil manipulação devida às duas fases distintas que o fungo apresenta, necessitando serem estimuladas *in vitro* para que passem de uma fase a outra (THOMAZELLA et al 2012), ficou claro a importância de se obter uma plataforma mais simples para o estudo de novos análogos químicos inibidores de *Mp-AOXp* para o controle da vassoura de bruxa.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Microrganismos e condições de cultura

A linhagem selvagem W303-1b (*MATa*, *ura3 Δ 0*, *leu2 Δ 0*, *his3 Δ 1*, *met15 Δ 0*) de *S. cerevisiae*, foi propagada em meio mínimo SD e posteriormente transformada pelo uso do vetor pYES2/CT (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A) ligado ao gene *Mp-AOX* e vetor vazio, gerando as “linhagens W303-1b+mpAOX e W303-1b+vetor vazio ($\emptyset$)”.

A linhagem W303-1b *S. cerevisiae* transformada foi propagada em meio mínimo SD-URA⁻.

- Meio SD-URA⁻: 0.7% de Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos + 0.5% Sulfato de Amônia, 2% de Glicose, 0.12% de DOPROUT (Mistura de todos os aminoácidos com exceção de Leucina, Uracila, Triptofano e Histidina), 0.8% de Histidina, 0.8% de Leucina, 0.8% de Triptofano; pH 6,5.
- Linhagem DH5 α (F⁻ 80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 - thi-1 gyrA96 relA1) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A).
- Meio para crescimento bacteriano Luria-Bertani LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl).
- Adição de 2% de ágar quando o meio de cultura for sólido.
- Meios de cultura de leveduras e bactérias ver AUSUBEL *et. al.*, 1994.
- Azoxistrobina, SHAM e *n*-propil galato foram doados pela Dra. Daniela Paula de Toledo THOMAZELLA (UNICAMP). Antimicina A foi obtida da Sigma- Aldrich. Peróxido de hidrogênio – Merck.

4.2. Clonagem e expressão do gene *Mp-AOX*

Para expressarmos o gene *Mp-AOX* foi utilizado o vetor pYES2/CT® (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A – Figura 5). Esse vetor permite a clonagem direcional por extremidades coesivas.

Figura 5: Esquema representativo do vetor pYES2/CT.

O grupo do Prof. Dr. Gonçalo A.G. Pereira gentilmente nos cedeu o gene *Mp-AOX* isolado, clonado em vetor pGEM-T. A reação de amplificação do gene *Mp-AOX* para inserção no pYES2/CT foi realizada utilizando os oligonucleotídeos específicos com adaptadores para as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* (ver tabela 1) em termociclador PCR System-9700 Gene amp (Applied Biosystems). As condições de amplificação consistiram de uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de

desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. A reação foi composta de 15pmol de cada iniciador (direto e reverso), 2.5 mM de cloreto de magnésio, tampão da *Taq* 1X (Invitrogen, Carlsbad,U.S.A), 2U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Carlsbad,U.S.A), 250uM de mix de dNTPs, 1ng de DNA molde (plasmídeo pGEM-T-*Mp*-AOX). Reações controle sem molde também foram realizadas.

TABELA 1: Sequências e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados.

Primer	Sequencia	Temperatura de Anelamento (TM)
AOXfw <i>HindIII</i>	5' CCC AAG CTT GGG ATG CTT GCG ATT CG3'	64°C
AOXrev <i>EcorI</i>	5' GGA ATT CCT CAT GAG TGT CCT GCG TTC GG 3'	63.9°C

O produto da PCR foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X (tris, ácido acético, EDTA), corado com brometo de etídio 0.5 µg ml⁻¹. A corrida eletroforética foi feita no sistema BIO-RAD powerpac basic, 70 volts por 1 hora e os fragmentos correspondentes ao tamanho do gene *Mp*-AOX de 1.137bp foram visualizados em transluminador (Major Science UVDI) com luz UV. Os fragmentos do gel de agarose foram registrados pela CANON (G10 power shot) acoplada ao transiluminador. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, Carlsbad,U.S.A).

As reações de digestão de DNA com *EcorI* e *HindIII* (NEW ENGLAND BIOLABS-NEB), consistiram em 50 µL da suspensão de plasmídeo pYES2\CT

ou produto de PCR *Mp-AOX*, 1µL BSA 100X, 1µL de cada enzima de restrição, 10µL de tampão NE2 ou 4 (10X) em volume final de 100 µL. As reações foram incubadas a 37° C por 2 horas. As reações de digestão precisaram ser sequenciais devido à incompatibilidade de tampões entre as duas enzimas. Assim, primeiramente o vetor ou o produto de PCR foram digeridos apenas com uma das enzimas por duas horas. Essa reação de digestão foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, submetida à eletroforese e os respectivos fragmentos correspondentes ao vetor e ao inserto foram isolados do gel e novamente digeridos com a outra enzima. As reações de purificação de bandas do gel de agarose foram realizadas através do “Illustra™GFX™ PCR DNA and GEL BAND Purification Kit da GE®.”, exatamente como indicado pelo manual do fabricante. Brevemente, foi adicionado 10 µL do tampão tipo 3 para cada 10 mg de gel de agarose recuperado (cortado do gel com auxílio de um bisturi) que foi incubado a 60°C até dissolver completamente o gel. Após dissolver o gel passa-se para uma coluna GFX do kit, que é um aparato com membrana com alta capacidade de adsorção de DNA. Incuba-se por 1min temperatura ambiente e centrifuga-se por 30s 16.000 g. Adiciona-se 500 µL do tampão tipo 1 (contendo etanol) sobre a membrana para lavagem e centrifuga-se a 16.000 g; descarta o recipiente da coluna GFX e coloca-se a coluna com membrana com o DNA ligado em um microtubo de 1.5ml livre de DNase. Para eluição aplica-se 50 µL do tampão de eluição tipo 4 e incuba por 1 min a temperatura ambiente. Por fim, centrifuga-se por 1 min a 16.000 g e guarda-se a amostra de DNA eluída à -20°C até o uso. O vetor pYES2/CT (2uL) e o gene *Mp-AOX* (6uL) previamente digeridos com *HindIII* e *EcoRI* e purificados, adicionados de 1 uL *Buffer* 10x, 1 uL de DNA ligase

(Promega, Fitchburg, Wisconsin) foram incubados a 4°C *overnight* para resultar na ligação pYES2/CT + *Mp-AOX*.

A linhagem de bactérias DH5α foi utilizada para transformação da reação de ligação pYES2/CT + *Mp-AOX*, por apresentar altas taxas de transformação e ser bastante eficiente quanto à propagação de plasmídeos. Para isso adicionamos 1μL da reação de ligação no eppendorf contendo 50μL de DH5α eletrocompetente e inserimos na cubeta para eletroporação. Eletroporamos (no equipamento *BioRad. modelo MicroPulser* nas seguintes condições: 25 Ω de condutância, 2,5 kV e 4,5-5,5 ms de pulso), adicionamos 1mL de LB fresco na cubeta para desprender as células bacterianas. As células eletroporadas foram incubadas por 1 hora a 37°C, sob leve agitação (100 rpms). Depois plaqueamos em meio sólido LB + ampicilina (150μg/mL).

As bactérias transformadas foram crescidas e os plasmídeos extraídos segundo o seguinte protocolo: Inóculos de colônias únicas isoladas (3mL de LB+Ampicilina 150μg/mL) crescidos por 16 horas a 37°C, foram centrifugados por 5 min (13Krpm). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em 100μl de GTE (50mM glicose; 25mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA), ao qual adicionou-se 200μl de solução de lise (1% SDS, 0.2M NaOH), incubando-se em temperatura ambiente por 5min. Adicionou-se 150μl de acetato de potássio 5M pH 5,3 misturando vigorosamente; centrifugou-se por 10min a 13Krpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf, ao qual se adicionou 400μl de isopropanol. A mistura foi centrifugada por 10min a 13Krpm, o sobrenadante descartado e o pellet foi lavado com 200-300μl de etanol 70% gelado. O etanol foi evaporado no *speed vac* (Eppendorf) por 5min e o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 50μl de TE (10mM Tris HCl pH 8,0,

0.1mM EDTA) + 1µl de RNase (10mg/mL) para remover o RNA contaminante (incubação por 20min a 37°C). A qualidade e quantidade dos plasmídeos foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. Esses plasmídeos foram utilizados como molde para reação de PCR (como descrito anteriormente) com primers específicos (tabela 1). Os vetores que apresentaram inserto foram submetidos à reação de sequenciamento, realizada segundo o protocolo SSDNA do IQ/USP, utilizando BigDye Terminator v.3.1. Utiliza-se (VF=15 µL) ~100 a 200ng de DNA plasmidial+inserto; 3 µL iniciador (C.final: 3,2 pmol/ µL); 3 µL 5x *sequencing Buffer*; 2 µL BigDye v3.1 e Água para completar o volume. Programa do termociclador: 1x a 96°C por 2 minutos; 35x a 96°C por 45s, 56°C por 30s e 60°C por 4 minutos e ∞ a 4° C.

O vetor pYES2/CT + *Mp-AOX* com a construção confirmada pelo sequenciamento foi utilizada para transformação da linhagem W303-1b. Para isso, células da levedura foram crescidas em 50mL de YPD até OD_{600nm} próxima a 0.8 e centrifugadas (3.000 g, 5 minutos, 4°C). O pellet foi lavado duas vezes com água milli Q estéril e uma vez com sorbitol 1M gelado. As células foram ressuspensas em 200µl de sorbitol 1M, gelado fresco, e mantidas em gelo. 100µL de células foram misturados à 500ng de DNA (plasmídeo pYES2/CT + *Mp-AOX*) e incubadas em gelo por 1 minuto. Foi adicionado então 200µl de sorbitol 1M gelado e a mistura foi eletroporada (cubeta de 0.2cm, voltagem de 1.25 kV, capacitância de 25Ω, tempo de eletroporação entre 4 e 5 mseg). As células foram centrifugadas (1 minuto, 13.000 g, 4°C), ressuspensas em 100µl de sorbitol 1M, plaqueadas em meio seletivo (no caso, YNB – glicose – URA⁻) e incubadas em estufa 30°C por volta de 5 dias. Colônias isoladas

foram novamente repicadas em meio seletivo para confirmação da auxotrofia, deixadas em estufa 30°C por 24 horas.

Para detectar e localizar a proteína *Mp-AOXp* foi realizada a técnica *Western blotting*, de acordo com metodologia padrão conforme descrito por SAMBROOK et al., 1989. De forma breve, amostras de 50 µg de proteína total foram aplicadas em gel desnaturante redutor (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Poly-acrylamide gel electrophoresis). Após eletroforese em tampão Tris-Glicina, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo primário específico Anti-V5 (Invitrogen®) que vem conjugado a uma fosfatase alcalina, o que dispensa o uso de anticorpo secundário para detecção. O anti-V5 foi utilizado na diluição 1:1000 e revelado na presença dos reagentes de detecção NBT/BCIP Reagent Kit (Invitrogen).

4.3. Isolamento de mitocôndrias de *S. cerevisiae*

O isolamento de mitocôndrias da linhagem transformada de *S. cerevisiae* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Glab e colaboradores (1990) e modificado por Magnani e colaboradores (2007). Basicamente, esferoplastos da linhagem W303-1b de *S. cerevisiae* foram obtidos através de tratamento enzimático com a enzima Zymolyase 100T (Seikagatsu Corp., Tokio, Japão) a 33 °C. A formação gradual dos esferoplastos foi acompanhada através de microscopia de luz determinando o tempo ideal de atuação da enzima. Uma vez obtidos, os esferoplastos foram rompidos utilizando-se homogeneizador Elvehjem–Potter (VWR®,

Pennsylvania,U.S.A) .Finalmente, a fração mitocondrial foi separada através de centrifugação diferencial (Eppendorf 5810r,) em tampão de isolamento apropriado. A quantidade de proteínas totais da amostra foi avaliada através do método de Bradford (Bradford, 1976).

4.4. Análise do consumo de oxigênio

Foram propagadas as linhagens de *S. cerevisiae* W303-1b+vetor vazio e W303-1b+*MpAOX* em meio SD URA⁻, conforme descrito no item 3.2, seguido de isolamento das mitocôndrias, brevemente descrito, alíquotas de 0,4 mg/mL de suspensão mitocondrial foram adicionadas à câmara de reação do Oxygraph-2k (Oroboros[®]) contendo 2 mL de tampão de respiração (600mM sorbitol,10mM tris pH 7,5 e 1mM EDTA), a temperatura de 30° acoplado ao eletrodo de oxigênio (Clark, marca, local) e o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido.

Para análise do perfil de consumo do oxigênio, as mitocôndrias foram energizadas com NADH 1mM, seguido da adição de ADP 300µM. A presença da atividade da AOXp foi verificada na presença de antimicina A 5µM e foi avaliada pelo consumo de oxigênio residual estimulado por GMP 1mM (estimulador específico da AOX de fungos) e inibido por n-propil galato 100µM (inibidor da AOXp).

4.5. Experimentos de análise de crescimento

Taxa de crescimento foi estudada por meio de curvas de crescimento, realizando leituras de densidade óptica no intervalo de 2 horas (tempo necessário para duplicação celular em *S. cerevisiae*). A leitura foi realizada no espectrofotômetro (eppendorf BioPhotometer plus) a 600_{nm}, e os dados foram

analisados e plotados na forma de gráfico.

4.6. Medição da biomassa seca

Os pré-inóculos foram crescidos em SD URA⁻ *overnight* a 30°C. As células foram diluídas em meio fresco de galactose ou glicose para OD_{600nm} inicial de 0.2. Os inóculos foram incubados em shaker a 30°C até alcançarem a fase log. 10 mL das amostras foram filtradas em membrana de poro 0.22µm (MILLI PORE). As membranas foram postas na estufa a 70°C por uma hora. Foi Aplicada a seguinte formula:

$$X = \Delta M \div \Delta V = MF - M_{inicial} \div 10 \times 1000 = G \therefore L$$

X=valor a ser obtido

Δm=variação de massa

Δv=variação de volume

MF=Massa final

4.7. Medição da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

S. cerevisiae não possui isoformas de AOX endógenas, o que facilita o controle negativo de efeitos da expressão desta enzima. A formação de H₂O₂ mitocondrial foi monitorada após incubação das organelas isoladas de leveduras expressando AOXp ou não, por 10 minutos a 30°C em tampão contendo 50µM de Amplex Red (Invitrogen, Carlsbad,U.S.A), 0.5 U/mL de horderadish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) 2% de etanol, 1 mM malato, 6mM glutamato e 100µg/mL de proteína mitocondrial. A produção de peróxido de hidrogênio foi medida por espectrofluorímetro F-2500 FL Spectrophotometer (Hitachi ,U.S.A.) utilizando excitação a 563 nm e

emissão a 587 nm (BUSSO et al.,2010).

Calibração

Para relacionar a fluorescência com a concentração de H_2O_2 , foi realizada uma curva-padrão com concentrações conhecidas.

- Foi diluída a solução estoque de H_2O_2 (cuja concentração diminui com o tempo) 1:1000 e medir a absorbância a 240 nm.
- Foi Calculado a concentração da solução estoque, em mols/L:

$$C = \frac{Abs \times diluição}{\varepsilon \times l} = \frac{Abs \times 1000}{43,6 \times 1}$$

- Realizar medidas usando tampão (Manitol 0,6 M, K_2HPO_4 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Hepes 20 mM, pH 6,8), 10 μ L HRP 200U/mL, 5 μ L Amplex Red 20 mM e adições seriadas de 3 μ L da solução H_2O_2 .
- A partir do gráfico obtido, foram observados os valores de fluorescência para cada adição de H_2O_2 e plotou-se um gráfico de fluorescência vs concentração de peróxido (calculando se a concentração final a cada adição). Foi obtido o coeficiente angular desse gráfico e usado como calibração (ver Análise de dados).

Análise de dados

- Encontrou-se o coeficiente angular de cada adição (a_{exp}) feita e, usando o coeficiente angular de calibração (a_{cal}), calcule a produção de peróxido por tempo por massa de proteína ($P_{H_2O_2}$):

$$P_{H_2O_2} = \frac{a_{exp}}{a_{cal} \times m_{proteína}} \left(\frac{\mu M}{s \times mg} \right)$$

4.8. Teste de viabilidade por diluição seriada

Foram realizados pré-inóculos em SD URA⁻ galactose crescidos a 30°C sobre agitação de 200 rpm no shaker (New Brunswick Scientific, Modelo: Innova 42) *overnight* (figura 6). No dia seguinte foram diluídas as linhagens W303-1b-vetor vazio e W303-1b+*Mp-AOX*, para OD_{600nm} inicial de 0.2. Após serem incubadas até as fases logarítmica e estacionária, alíquotas foram retiradas, a densidade ótica foi corrigida novamente para 0.2 e diluições seriadas de 5X foram plaqueadas em SD URA⁻ (2% de glicose) contendo ou não os diferentes bloqueadores da cadeia principal e/ou alternativa: antimicina A (1mg/L) e Azoxistrobina (1mg/L), SHAM (0,75 g/L). As placas foram incubadas por 3 dias à 30°C em estufa e foram foto documentadas.

Figura 6: Teste de viabilidade por diluição seriada.

4.9. MEDIÇÃO DE GLUTATIONA (dosagem da razão GSH/GSSG)

Os pellets de levedura foram rompidos com 1 volume de esferas de vidro e de 2 volumes de Ácido sulfosalicílico 3,5%. A suspensão foi submetida a vórtice durante 20 min a 4 °C, e centrifugadas a 13.000 rpm, 4 °C . Este procedimento foi repetido duas vezes e os sobrenadantes foram combinados. A glutathiona total, bem como GSSG foram ensaiadas tal como descrito anteriormente (M. Demasi, & R. Shingarpure ; 2001).

Resumidamente, glutathiona total foi determinada por reação com DTNB (76 µM), na presença de glutathiona redutase (0,12 U / ml) e NADPH (0,27 mM). Para determinação de GSSG, as amostras foram incubadas durante 1 h com N-ethylmaleimide (NEM- 5 mM) depois de ajustar o pH para 7,0 com NaOH. A concentração de GSH foi determinada pela a diferença entre a glutathiona total e GSSG. As amostras foram normalizadas pela quantidade de proteína em mg (método Bradford).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A AOXp está presente em diversos organismos como plantas superiores, muitos fungos, protistas, algumas bactérias e alguns poucos animais. Devido ao fato desta enzima desacoplar o transporte de elétrons da síntese de ATP, a elucidação da função deste *escape* da cadeia de transporte de elétrons é ainda objetivo de inúmeras pesquisas (HO et al. 2007; MAGNANI et al. 2007; MAGNANI et al. 2008). Ocasionalmente, o desacoplamento promovido por AOXp leva a energia produzida pela oxidação das moléculas a ser liberada na forma de calor. Esta produção de calor tem importante participação no ciclo reprodutivo de plantas da família Araceae, que utilizam o aumento de temperatura pela atividade da AOXp para volatilização de aminas e atração de insetos polinizadores (WAGNER et al. 2008).

Como descrito por alguns autores, AOXp tem papel fundamental na proteção de diversos fungos fitopatogênicos a antifúngicos que atuam no complexo III mitocondrial (STANIC et al. 2013, TING XU et al. 2013, TOMOO SHIBAA et al. 2012, SARASA et al. 2013, YOSHIDA et al. 2013, HASSAN & BILITEWSKI et al. 2013). A proteína codificada pelo gene AOX é composta por 378 aminoácidos, sendo os 40 primeiros resíduos correspondentes ao peptídeo de sinalização para mitocôndria. Muitas regiões conservadas das proteínas AOXp já foram descritas para outros fungos e plantas também (MOORE, UMBACH & SIEDOW 1995; SIEDOW et al 2000).

O gene AOX de *M. perniciosus* foi caracterizado por THOMAZELLA et al 2012, sendo constituído por dez éxons e nove introns, sendo estes números bastante variáveis nos diferentes organismos já estudados. De modo geral, a AOXp de microrganismos é codificada por um ou poucos genes nucleares,

enquanto que plantas superiores possuem uma família multigênica, tradicionalmente dividida em duas subfamílias, *aox1* e *aox2* (ALBURY ET AL., 1996). Finalmente, verificou-se que o gene *Mp-AOX* codifica para uma enzima AOXp funcional, cuja a atividade foi confirmada por meio de ensaios de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas do fungo da vassoura de bruxa (THOMAZELLA et al., 2012).

Iniciamos pela obtenção do gene *Mp-AOX* isolado e com adaptadores adequados para clonagem no vetor de expressão em *S. cerevisiae*. Para isso, o gene *Mp-AOX* foi amplificado por PCR do vetor pGEM-T (gentilmente cedido pelo LGE-UNICAMP) usando oligonucleotídeos específicos (tabela 1). Para expressar o gene *Mp-AOX* na levedura escolhemos usar o vetor pYES2/CT (Invitrogen). Esse vetor permite a clonagem direcional com extremidades coesivas e expressão forte controlada por galactose. A clonagem foi realizada retirando-se o códon original de terminação da tradução de *Mp-AOX* para que fosse gerada uma proteína recombinante em fusão C-terminal com a cauda de histidina e o epítipo V5 presentes no vetor (figura 5). O inserto obtido possui o tamanho esperado de 1137bps e relativo grau de pureza (figura 7A). Após reação de ligação e transformação, foram recuperados plasmídeos pYES2/CT+*Mp-AOX*. Como a clonagem é direcional, testamos apenas a presença ou ausência do inserto no vetor através da reação de PCR (figura 7B) com oligonucleotídeos específicos (tabela 1).

Figura 7. Foto do gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de (A) PCR referentes ao isolamento do gene *Mp-AOX* do vetor pGEM-T. (B) produtos de PCR do gene *Mp-AOX* usando diferentes clones do vetor pYES2/CT-*Mp-AOX*). Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

A construção e integridade do gene foram verificadas através de reação de sequenciamento de DNA. Após a construção do vetor foi realizada a transformação da linhagem W303-1b com vetor pYES2/CT vazio (controle) e com pYES2/CT+*Mp-AOX*.

Por se tratar de uma proteína de função mitocondrial e estar sendo expressa de forma heteróloga em *S. cerevisiae*, um dos primeiros controles experimentais foi sua expressão e correta localização intracelular na levedura. Para detectar e localizar a proteína *Mp-AOXp* foi realizada a técnica Western blotting, usando o anticorpo comercial anti-V5, pois a proteína *Mp-AOXp* recombinante expressa em *S. cerevisiae* está em fusão C-terminal com uma cauda de histidina e o epítipo V5. Como observado na figura 8, a *Mp-AOXp* foi expressa com sucesso e localiza-se na mitocôndria da levedura *S. cerevisiae*, onde provavelmente essa proteína pode executar corretamente sua função.

Figura 8: Western blot da proteína *Mp*-AOXp de peso aproximado de 40kDA, marcada com anticorpo Anti-V5, revelada com fosfatase alcalina. Mitocôndria (MIT (AOX)), Citosol (Cito (AOX)), Mitocôndria (vetor vazio MIT Ø), Citosol (vetor vazio Cito Ø).

Uma das hipóteses para a resistência do fungo *M. perniciosus* aos antifúngicos convencionais (inibidores da cadeia principal de transporte de elétrons na respiração) seria a presença e atividade de *Mp*-AOXp. Essa enzima é mais expressa na fase biotrófica do fungo (THOMAZELLA et al., 2012), fase essa de baixa proliferação celular. Imagina-se que essa baixa formação de biomassa seria causada pela baixa produção de ATP, consequência da presença e atividade de *Mp*-AOXp que desviaria o fluxo de elétrons para menor geração de ROS, mas com o custo de menor taxa de crescimento. Esse “custo” poderia ainda ser considerado estratégia de infecção do fungo, pois durante a fase biotrófica os tecidos da planta estão vivos e em plena atividade de defesa.

Affourtit e colaboradores transformaram a levedura *Schizosaccharomyces pombe* com o gene *AOX* de *Sauromatum gutattum*. Neste trabalho, eles verificaram diferenças interessantes quanto à taxa de crescimento e formação de biomassa da levedura transformada. Os autores concluíram que os efeitos sobre o crescimento da levedura são consequências da atividade da oxidase alternativa da planta sobre o metabolismo energético da levedura, pois a atividade desta enzima resulta em um menor aproveitamento e conservação de energia na forma de ATP (Affourtit et al., 2002).

Assim, para se analisar se a expressão de *Mp-AOXp* influencia o padrão de crescimento da levedura realizamos a curva de crescimento e a medição da massa seca das linhagens recombinantes em glicose e em galactose. Uma das características do vetor pYES2/CT é a regulação da expressão da proteína recombinante através do promotor *GAL1* (figura 5). Esse promotor é considerado muito forte quanto a sua capacidade de indução da expressão da proteína sob sua regulação e é reprimido pela presença de glicose e altamente induzido pela presença de galactose.

A figura 9 mostra a curva de crescimento das linhagens controle (W303-1b vetor vazio) e W303-1b + *Mp-AOX* em glicose (condição de repressão do promotor *GAL1*) e em galactose (condição de ativação do promotor *GAL1*).

Figura 9: Gráfico representado a curva de crescimento na presença de diferentes fontes de carbono, glicose (verde e roxo), galactose (azul e vermelho) das linhagens transformadas. Representando a condição de inibição da expressão de *Mp-AOX*, células crescidas em glicose (verde e azul) e o vetor vazio (Azul e vermelho). Todas as curvas foram realizadas em meio mínimo SD-URA⁻, realizando a leitura da densidade óptica a cada 2 horas partindo da OD_{600nm} inicial de 0.2.

Podemos observar na figura 9 que as linhagens onde há pouca ou nenhuma expressão do gene *Mp-AOX* (verde, vermelho e azul) o crescimento celular foi maior em relação à linhagem expressando *Mp-AOX* (roxo). Como galactose não é a fonte de carbono preferencial da levedura *S. cerevisiae* (GANCEDO, 1998), nota-se um claro prolongamento da fase lag nessas condições, mesmo para a linhagem com vetor vazio (linha vermelha). No entanto, comparando as linhagens na mesma fonte de carbono, nos tempos 4 e 8 horas em galactose (linhas vermelha e roxa), a levedura com vetor vazio triplica o valor de densidade óptica, enquanto a levedura expressando *Mp-AOX* não consegue nem dobrar esse valor. Quando se comparam os padrões de

crescimento em glicose observamos que mesmo em condição de repressão do promotor *GAL1* deve ocorrer um escape de transcrição, pois a levedura com o vetor vazio cresce em taxa maior, especialmente após 8 horas, tempo em que a concentração de glicose no meio deve estar baixa.

Para confirmar esses resultados, realizamos experimentos para medir a produção de massa seca nessas leveduras (figura 10).

Figura 10: Gráfico de barras representando a medição da biomassa seca em diferentes condições: glicose representando a inibição do promotor *GAL1* e galactose representando a ativação do promotor *GAL1*. Em azul a levedura transformada com o vetor vazio e em vermelho a levedura transformada com o vetor pYES2/CT+*Mp-AOX*. * e # Diferença estatisticamente significativa de acordo com teste *t student* pareado, com $p < 0.01$.

Como observado na figura 10, a linhagem transformada apenas com o vetor vazio pYES2/CT (barras azuis) teve diminuição na formação de biomassa causada pelo crescimento em galactose, resultado esperado e de acordo com os resultados obtidos na figura 9, por ser fonte alternativa de carbono para *S. cerevisiae*. Contudo, ao compararmos as biomassas geradas na mesma fonte de carbono, na presença ou ausência de *Mp-AOXp*, notamos que em glicose

(menor expressão) não há diferença estatisticamente significativa. Já em galactose, condição de máxima expressão de *Mp-AOXp* observamos diferença significativa; a biomassa produzida pela levedura com vetor vazio é cinco vezes maior que a produzida pela levedura expressando *Mp-AOXp*.

A proteína *Mp-AOXp* pode atuar na diminuição da formação de biomassa celular devido ao desacoplamento da cadeia respiratória à produção de ATP. Desse modo, ao desacoplar a produção de ATP, a célula produz menos energia levando a uma diminuição das funções celulares dependentes de ATP, principalmente a proliferação celular (ALBURY *et al* 1996; MINAGAWA & YOSHIMOTO 1987).

No trabalho realizado por Magnani e colaboradores (2007), o gene *AOX* de *A. fumigatus* foi clonado em *S. cerevisiae* e os efeitos desta expressão heteróloga foram verificados. Dentre estes efeitos, observou-se a ocorrência de resistência ao cianeto (inibidor do complexo IV) pela levedura transformada. A utilização da levedura *S. cerevisiae* como um modelo para a expressão heteróloga do gene *AOX* é bastante pertinente, uma vez que esta levedura é um dos poucos fungos que não apresentam o gene da oxidase alternativa em seu genoma. Tal abordagem é bastante interessante, pois faz uso de um sistema biológico robusto e de fácil manipulação, trazendo resultados a respeito dos efeitos fisiológicos da expressão e atividade do gene *AOX* em um organismo vivo.

Para verificar a atividade da *Mp-AOXp*, buscamos analisar a funcionalidade da oxidase alternativa de *M. perniciosus*, através do consumo de oxigênio de mitocôndrias expressando essa proteína heteróloga. A participação de cada via de transporte de elétrons foi verificada utilizando-se os inibidores:

da via principal antimicina A, e da AOXp o n-propil galato.

Como observado na figura 11 o padrão de consumo de oxigênio foi modificado pela expressão da *Mp-AOXp* em mitocôndrias de *S. cerevisiae*. Apenas a título de esclarecimento, os platôs da figura representam o atraso de leitura do equipamento durante as adições dos diferentes compostos. Em ambos os quadros podemos observar a respiração no início da adição da mitocôndria (MIT) com um pequeno declínio da curva representando o consumo de oxigênio e logo após um grande consumo ao serem adicionados os substratos NADH e ADP. Isso mostra que em ambas as mitocôndrias (com e sem *Mp-AOXp*) a cadeia respiratória principal está funcionando corretamente. A maior diferença se dá ao ser adicionado o bloqueador da cadeia principal antimicina A, que inibe completamente a atividade respiratória nas mitocôndrias sem *Mp-AOXp* (quadro A), só havendo a reativação do consumo devido à adição de GMP. Observa-se ainda que o n-propil galato não tem efeito nas mitocôndrias sem *Mp-AOXp* (Figura 11, quadro A). Contudo, fica claro que a *Mp-AOXp* está mantendo o consumo de oxigênio nas mitocôndrias que expressam essa proteína (quadro B), mesmo após a adição de antimicina A, evidenciando a participação e funcionalidade da oxidase alternativa no consumo de oxigênio dessas mitocôndrias. Além disso, fica clara a inibição do consumo de oxigênio pela adição de n-propil galato, representado no último platô (figura 11, quadro B).

Figura 11: Padrão de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas da linhagem de *S. cerevisiae* W303-1b-vetor vazio, sem expressar *Mp-AOXp* (A) e W303-1b+*MpAOXp* (B). NADH 2mM foi utilizado como substrato respiratório e ADP como substrato para o complexo enzimático ATP sintase. Após a inibição da cadeia respiratória principal pela antimicina A, o consumo de oxigênio foi analisado na presença de GMP (estimulador da AOXp) e do n-propil galato (inibidor da AOXp).

Na planta *Arabidopsis thaliana*, a proteína AOXp é expressa constitutivamente e o gene que a codifica possui regiões que são conservadas, sugerindo que essa via alternativa é uma rota importante no metabolismo dessa planta (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997). Entretanto, a função dessa via nesse organismo não está totalmente esclarecida. A AOXp tem sua expressão aumentada quando a planta é exposta a baixas temperaturas e ao ataque de patógenos (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992, 1997). Esse tipo de respiração foi mais bem definido na florescência termogênica de *Sauromatum guttatum* (MEEUSE, 1975). Neste organismo o calor é produzido e liberado em flores efêmeras durante um único dia de florescência, volatilizando aromas com o objetivo de atrair insetos polinizadores (McINTOSH, 1994).

Alguns estudos têm proposto que a AOXp pode prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao estresse (WAGNER, 1995; MILLAR & DAY, 1996, 1997; MAXWELL *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004). As proteínas AOXp e *proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas* (PUMP) mostraram similaridades fisiológicas, pois ambas são dissipadoras de energia (SIEDOW & BERTHOLD, 1986; VERCESI *et al.*, 1995; WAGNER & KRAB, 1995; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004) e protetoras contra ROS. Além disso, AOXp e PUMP são estimuladas por baixas temperaturas (ELTHON *et al.*, 1986; LALOI *et al.*, 1997; NANTES *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004).

Apesar dessa similaridade, essas proteínas podem ter diferentes funções. De fato, AOXp e PUMP são reguladas de modo inversamente proporcional pelos ácidos graxos livres. A PUMP é ativada pelo aumento da

concentração de ácidos graxos enquanto que a atividade da AOXp é progressivamente diminuída, sugerindo que as proteínas não podem expressar a atividade máxima simultaneamente (SLUSE *et al.*, 1998; CALEGARIO *et al.*, 2003).

Uma das hipóteses a respeito da expressão de *Mp-AOX* levar a uma diminuição na síntese de ATP por desviar os elétrons da via respiratória principal, seria diminuir a geração de ROS e que isso levaria a uma diminuição na taxa de crescimento celular. Além disso, *Mp-AOX*, especialmente em *M. perniciosa* que curiosamente (de forma incomum) estende sua fase biotrófica por muito tempo, causaria uma diminuição nos níveis de ROS por dar destino rápido aos elétrons da cadeia respiratória principal bloqueada por inibidores. No início da infecção, o fungo está na fase biotrófica, com crescimento lento. A planta inicia uma resposta ao patógeno aumentando os níveis de óxido nítrico (NO) nos tecidos infectados. Esse NO seria o responsável por inibir a cadeia principal de elétrons de *M. perniciosa*, que mesmo assim estende a fase biotrófica. Essa longa fase biotrófica em *M. perniciosa* seria permitida pelo alto nível de expressão gênica de *Mp-AOX* (THOMAZELLA, D.P.T., *et al* 2012). Ironicamente, a própria planta acaba sofrendo os efeitos tóxicos do NO. Os galhos infectados morrem e viram alimento para a *M. perniciosa*, que passa rapidamente para a fase necrotrófica, em que se alimenta do tecido morto (THOMAZELLA, D.P.T. *et al* 2012).

Como a AOXp vem sendo uma proteína relacionada ao alívio do estresse oxidativo em diferentes microrganismos realizamos o ensaio de quantificação da produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial (figura 12).

Figura 12: A formação de H_2O_2 mitocondrial foi monitorada durante a incubação das organelas isoladas de leveduras expressando *Mp-AOX* ou não, por 15 minutos a 30°C em tampão contendo 50µM de Amplex Red (Invitrogen), 0.5 U/ml de horseradish peroxidase (Sigma), 2% de etanol, 1 mM malato, 6mM glutamato e 100µg/ml de proteína mitocondrial. A produção de peróxido de hidrogênio foi medida por espectrofluorímetro, F-2500 FL Spectrophotometer- com excitação a 563nm e emissão a 587 nm (BUSSO et al., 2010).

DEMASI AP (2001) demonstrou em seus experimentos que ao bloquear o complexo III por meio da adição da antimicina A aumentava consideravelmente o acúmulo de ROS. Como descrito por diversos autores a AOXp pode atuar no alívio do estresse oxidativo quando bloqueado o complexo III mitocondrial, reduzindo o oxigênio livre à molécula de água doando 4 elétrons de uma só vez, o que diminui a possibilidade de um aumento significativo do estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS) (INOUE *et al.*, 2012; HASSAN & URSULABILITEWSKI 2013; FILIPPOU, 2012; JASON D. et al 2013; FRANK E. NARGANG, 2012; C. ODDS. 2005; CVETKOVSKA & VANLERBERGHE, 2013; MALLOA, et al 2013; MLEJNEK, 2013; TING XU, et al, 2013). Na figura 12 observamos que as mitocôndrias de

levedura expressando *Mp-AOXp* produzem menos peróxido de hidrogênio. Analisando apenas a parte linear da curva e suas respectivas equações de reta, concluímos que a expressão da *Mp-AOXp* provocou uma taxa 7 vezes menor de produção de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias. Dessa forma, nossos dados sugerem que a atividade de *Mp-AOXp* leva a um alívio no estresse oxidativo de mitocôndrias que expressam essa proteína.

COSTA DE OLIVEIRA (2012) e colaboradores com intuito de determinar qual a relevância desta via alternativa na resistência ao estresse oxidativo em *Candida krusei*, submeteram vários isolados clínicos que expressavam AOX a diferentes indutores de estresse oxidativo (peróxido de hidrogênio, menadiona e plumbagina) e a dois antifúngicos o fluconazol e o voriconazol com e sem inibidor da AOX, o ácido salicílico hidroxâmico (SHAM). Seus resultados mostraram que o fluconazol e o voriconazol induzem a produção de ROS numa percentagem muito pequena, aproximadamente entre 0 e 10%, sugerindo que a indução de estresse oxidativo não é o principal mecanismo na base do efeito fungistático destes dois antifúngicos. No entanto, a inibição específica da AOX pelo SHAM resultou num aumento da percentagem de células com ROS acumulados para ambos os tratamentos. Estes dados parecem sugerir que estes antifúngicos podem, eventualmente, induzir algum estresse oxidativo e que a atividade da AOX permite às células diminuir a produção de ROS, revelando o possível envolvimento desta enzima na resistência aos antifúngicos indutores de estresse oxidativo. A relevância da atividade da AOX na resistência ao estresse oxidativo foi reforçada pelos resultados obtidos nos tratamentos com os indutores de estresse oxidativo, o peróxido de hidrogênio, a menadiona e a plumbagina os quais mostraram que a atividade da AOX,

presente nos isolados clínicos de *C. krusei*, permite diminuir a produção de ROS e muito provavelmente conferir alguma resistência a estas células. Este estudo permitiu elucidar a ação da AOX como um dos possíveis mecanismos de defesa que poderá contribuir para compreensão da resistência de *C. krusei* aos agentes antifúngicos.

Ao compararmos nossos dados com os já observados na literatura podemos sugerir que a AOXp de *M. perniciososa* atua na diminuição de ROS mitocondrial. Isso pode fazer com que o fungo consiga crescer mesmo em contato com azoxistrobinas, bloqueador do complexo III, antifúngico usado amplamente na lavoura cacaueira.

Para observar os efeitos dos principais bloqueadores azoxistrobina (bloqueador do complexo III) e SHAM (bloqueador específico de AOX), na viabilidade da *S. cerevisiae*, realizamos o teste por diluição seriada (figura 13). Os pesquisadores do LGE da UNICAMP observaram que o uso desses dois bloqueadores se mostraram eficazes no combate ao fungo *M. perniciososa* em laboratório, porém não se mostraram eficazes em campo.

A linhagem W303-1b+pYES2/CT (controle vetor vazio) não mostrou sensibilidade na presença das concentrações utilizadas de azoxistrobina ou de SHAM. No entanto, as células que expressam Mp-AOXp são insensíveis à azoxistrobina e ao SHAM nas concentrações utilizadas, mas são sensíveis à combinação de Azoxistrobina e SHAM.

Figura 13: Teste de viabilidade das leveduras expressando ou não Mp-AOXp na presença dos principais bloqueadores azoxistrobina (complexo III) e SHAM (AOX). DMSO foi utilizado como solvente e, portanto, utilizado como controle (A). As células foram crescidas em meio SD-URA⁻ a 30°C até a fase LOG a partir de uma OD_{600nm} de 0.2, 5uL de cada diluição seriada de 5X foram aplicados em placa de SD-URA⁻ contendo 1,5% DMSO, 1mg/L azoxistrobina, 0,75g/L SHAM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.

Esperava-se que ao adicionarmos azoxistrobina na placa de cultivo (sendo um bloqueador do complexo III) a linhagem não expressando *Mp-AOXp* demonstraria uma sensibilidade aumentada, porém o mesmo não aconteceu. Contudo, Fisher e Meunier (2005) descreveram que mutações no citocromo b de leveduras *S. cerevisiae* levam à resistência à azoxistrobina. Já em 2006, Hnátová et al. descreveram diversos genes ou mutações de ponto, tanto no genoma nuclear como no genoma mitocondrial, que levaram à resistência de *S. cerevisiae* às estrobilurinas, incluindo azoxistrobina. Podemos sugerir que a linhagem W303-1b deva conter alguma dessas mutações que levam à resistência à azoxistrobina, como observado em nossos resultados.

Assim, diante dessa resistência da *S. cerevisiae* à estrobilurinas, realizamos o mesmo experimento de diluição seriada só que desta vez com o bloqueador do complexo III antimicina A (figura 14).

Figura 14: Teste de viabilidade das leveduras expressando ou não *Mp-AOXp* na presença dos principais bloqueadores antimicina A (complexo III) e SHAM (AOX). DMSO foi utilizado como solvente e, portanto, utilizado como controle (A). As células foram crescidas em meio SD-URA⁻ a 30°C até a fase LOG a partir de uma OD_{600nm} de 0.2, 5uL de cada diluição seriada de 5X foram aplicados em placa de SD-URA⁻ contendo 1,5% DMSO, 1mg/L antimicina A, 0,75g/L SHAM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.

Como foi observado na figura 14 na presença do bloqueador antimicina A, a linhagem que expressa o gene *Mp-AOX* mostrou ser mais sensível ao invés de apresentar uma resistência, como amplamente relatado na literatura (INOUE *et al.*, 2012; HASSAN & URSULABILITEWSKI 2013; FILIPPOU, 2012; JASON D. *et al* 2013; FRANK E. NARGANG, 2012; C. ODDS. 2005; CVETKOVSKA & VANLERBERGHE, 2013; MALLOA, *et al* 2013; MLEJNEK, 2013; TING XU, *et al*, 2013). Mesmo em diferentes organismos foi mostrado que AOX é responsável em conferir resistência a bloqueadores do complexo III. Em 2012, THOMAZELLA *et al.*, descreveram *in vitro* a capacidade do fungo *M. perniciosus* de desenvolver hifas mesmo na presença de bloqueadores do complexo III, mostrando sensibilidade somente exposição conjunta à azoxistrobina e SHAM (bloqueador específico da AOXp). Nossos dados parecem ser contraditórios ao que já foi observado e descrito na literatura. Assim, realizamos a medida de um parâmetro de estresse oxidativo clássico em leveduras, a razão de glutathiona reduzida x glutathiona oxidada.

GSH está presente em animais, plantas e bactérias aeróbias, normalmente encontrada em concentrações na escala milimolar. Na sua forma oxidada (GSSG), duas moléculas de glutathiona estão unidas por meio de uma ponte dissulfeto intermolecular entre os dois grupos sulfidrilas de suas cisteínas. Além de atuar como substrato para Gpx, têm como função vital a manutenção do balanço redox intramolecular atuando como um tampão redox. Alterações no balanço redox (refletidos na razão GSH/GSSG) geram eventos de sinalização que levarão, no caso de um estresse oxidativo, a transcrição de enzimas antioxidantes. Em pH fisiológico, GSH está presente em grande parte na forma protonada, devido ao fato de seu pKa estar em torno de 9,2. Isso

desfavorece sua reação com dissulfetos, pois a forma protonada não é um nucleófilo. Entretanto, as suas altas concentrações intracelulares tornam a reação cineticamente favorável. No citosol de células normais, a relação de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é alta. Isso se deve, em parte, à redução de GSSG para GSH pela enzima glutathiona redutase (GR), que catalisa a reação de redução de GSSG á custa da oxidação de NADPH (HALLWELL & GUTTERIDGE, 2007).

TABELA 2: medição da GSH e GSSG.

	GSH TOTAL(nmol/mg de proteína)	GSH reduzida (nmol/mg de proteína)	GSSG (nmol/mg de proteína)	GSH/GSSG
Vetor vazio Galactose	10,5	10,35	0,15	70
AOX Galactose	11	10,99	0,003	3,666

A calibração foi feita com GSSG comercial (Sigma). Os valores de GSH foram obtidos subtraindo a concentração de glutathiona oxidada da total.

Como podemos observar na tabela 2, a expressão do gene *Mp-AOX* foi responsável em diminuir o estresse oxidativo em relação a linhagem que não expressa o gene (vetor vazio). Esses dados complementam e afirmam nossa hipótese de que a expressão do gene *Mp-AOX* em *S. cerevisiae* pode aliviar o estresse oxidativo devido ao desvio (by pass) de eletrons durante a respiração celular. Já foi demonstrado durante a caracterização de um mutante do tipo Knockout para o gene *AOX1* do basideomiceto *Cryptococcus neoformans*, que a interrupção desse gene causa uma grande sensibilidade ao estresse

oxidativo, bem como reduzida patogenicidade em camundongos, corroborando assim o papel central da via alternativa como um fator de patogenicidade deste fungo e envolvendo o mecanismo com a resposta antioxidante (AKHTER et al., 2003).

Contudo, não conseguimos compreender como a linhagem que foi capaz de aliviar o estresse oxidativo, não apresenta resistência à exposição de antimicina A (bloqueador do complexo III), nem à exposição ao peróxido de hidrogênio em nossos testes de viabilidade. Possivelmente, pode ter ocorrido uma hipersensibilidade aos compostos pela super expressão do gene *Mp-AOX* uma vez que foi utilizado um vetor que possui seu promotor fortemente regulado por galactose. Por esse motivo não poderíamos descrever o quanto a super expressão deste gene aumenta ou não a sensibilidade das linhagens aos bloqueadores do complexo III, ou drogas que afetam mitocôndrias no geral. Como o gene expresso é de origem de outro fungo, *M. pernicioso*, que por sua vez é um fungo filamentoso, quando realizamos uma expressão heteróloga deste tipo, temos que levar em conta a adaptação do organismo à expressão de um novo fenótipo que pode ser tóxico a ele ou não.

De toda forma, acreditamos que mesmo não oferecendo resistência contra exposição direta das células de levedura ao peróxido, nossos dados indicam fortemente uma função antioxidante de *Mp-AOXp* que, em seu organismo de origem, coordenada às interações e funções de outras proteínas, pode ter sim papel crucial na resistência do fungo causador da vassoura de bruxa aos antifúngicos baseados em inibição do complexo III.

Pelo fato de *Mp-AOXp* ter se mostrado funcional, isto é, corretamente localizada na mitocôndria e realizando o consumo de oxigênio mesmo na

presença de antimicina A, acreditamos ter obtido uma boa plataforma de estudos para inibidores químicos de *Mp-AOXp*. Isto porque a expressão e função da *Mp-AOXp* levou a observação de um fenótipo fácil e muito reprodutível, que é a diminuição significativa de biomassa, possível de ser observada a olho nú, mas facilmente quantificável por espectrofotometria.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam, que o gene *Mp-AOX* expresso na linhagem W303-b foi responsável em diminuir a biomassa seca (figura 10). A funcionalidade biológica de *Mp-AOX* foi observada por meio da medição do consumo de oxigênio (figura 11), em relação a linhagem que não expressa *Mp-AOX*, pois as mitocôndrias isoladas expressando *Mp-AOX* foram capazes de consumir oxigênio mesmo com o bloqueio do complexo III devido à adição de antimicina A, só interrompendo este consumo com a adição de *n-propil galato* bloqueador específico da AOX. A expressão de *Mp-AOX* foi capaz de diminuir a produção de peróxido de hidrogênio, (figura 12 - mitocôndrias isoladas) e também o estresse oxidativo (células), mostrado na relação da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (tabela 2). Sugerimos que o gene *Mp-AOX* é capaz de exercer papel fundamental na proteção e sobrevivência do fungo *M. pernicioso*, mesmo na presença de antifúngicos.

7. BIBLIOGRAFIA:

- ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N. & SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacauzeiro. In: KIMATI, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Carmago, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. Ed, 2005.**
- ANDEBRHAN, T. **Rain water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer within cacao trees.** In: International cocoa research Conference, 10., Santo Domingo, 1987. p. 363-366', 1988.
- A CEPLAC. Disponível em: [//www.ceplac.gov.br/paginas/ceplac/ceplac.asp](http://www.ceplac.gov.br/paginas/ceplac/ceplac.asp). Acesso em: 22 de jan. 2014.
- ATKINSON, A. & WINGE, DENNIS R. **Metal Acquisition and Availability in the Mitochondria.** ACS Chem. Rev 109:4708-4721, 2009.
- AFFOURTIT, C., ALBURY, M. S., KRAB, K., MOORE, A. L. **Functional expression of the plant alternative oxidase affects growth of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** J Biol.Chem. 274,6212-6218,1999.
- ALBURY, M. S., ELLIOTT, C., MOORE, A. L. **Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition.** Biochimica et Biophysica Acta 1797: 1933–1939, 2010.
- ANKE, T. **The antifungal strobilurins and their possible ecological role.** Canadian journal Botany, Ottawa, v. 73, suppl.1, p. 940, 1995.
- AVERY, A.M & AVERY, S.V. **Saccharomyces cerevisiae expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases.** J. Biol. Chem., 276: 33730-33735, 2001.
- BROACH, J.R.; PRINGLE, J.R. AND JONES, E.W. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1991.**
- BASTOS, C. & DIAS. **redução na produção de basidiocarpos de *crinipellis perniciosa* por *trichoderma viride*.** summa pahytopathologica 18, 235-238, 1992.
- BASTOS, C. N. **Efeito inibitório de extratos de cultivares de cacau e compostos fenólicos sobre a germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*.** In Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, 10, 1987. Proceedings. Santo Domingo, Republica Dominicana. pp. 371-374, 1988.
- BASTOS, C. N.. **Efeito protetor e curativo de fungicidas sobre *C. perniciosa* em mudas de cacauzeiro.** In Belém, CEPLAC/ DEPEA. Informe de Pesquisas. pp.58-63. 1987.

BAKER, R.E.D.; HOLLIDAY. **Witches' broom disease of cocoa (*Marasmius perniciosus* Stahel)**. Kew England, 1957.

BARROS, M. H. E NÓBREGA, F. G. **Caracterização de uma nova função mitocondrial. Clonagem e estudo de dois genes essenciais de *Saccharomyces cerevisiae***. 1-102:10-14p. Tese apresenta ao Instituto de Biociências para obtenção do título de doutor, 1999.

BROADWATER, J. A., J. AI, T. M. LOEHR, J. SANDERS-LOEHR, AND B. G. FOX. **Peroxo-diferric intermediate of stearyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase: oxidase reactivity during single turnover and implications for the mechanism of desaturation**. *Biochemistry* 37: 14664-14671, 1998.

BARTLETT, D. W., J. M. CLOUGH, J. R. GODWIN, A. A. HALL, M. HAMER. **The strobilurin fungicides**. *Pest Management Science* 58: 649-662, 2002.

BOTSTEIN D, FINK GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*. n. 189, n. 3, p. 695-704. nov. 2011.

COSTA, J.C.B. et al. **Controle biológico da vassoura de bruxa do cacauzeiro da Bahia, Brasil**. In: BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2009, p. 245-266.

CEITA, G.O., MACÊDO, J. M. A., SANTOS, B. T., ALEMANO. L., GESTEIRA, A. S., MICHELI, F., MARIANO, A. C., GRAMACHO, A. P., SILVA, D. C. **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa***. *Plant Science*, 173, 2, 106-117, 2007.

CRONSHAW, D. K. **Fungicide application together with cultural practices to control cocoa diseases in Ecuador**. *Tropical Agriculture* 56: 155-170, 1979.

CLIFTON, R., LISTER, R., PARKER, K.L., SAPPL, P.G., ELHAFEZ, D., MILLAR, A.H., DAY, D.A., WHELAN, J. **Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana***. *Plant Molecular Biology* 2005.

CASTRO, G. N. A., J. S. RODRIGUEZ-ZAVALA, A. MARIN-HERNANDEZ, S. RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, AND R. MORENO-SANCHEZ. **Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd(2+) stress in *Euglena***. *J.Bioenerg.Biomembr.* 40: 227-235, 2008.

- CLIFTON, R., A. H. MILLAR, AND J. WHELAN. **Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses.** Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics 1757: 730-741,2006.
- COHEN, M.V. **Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?** Ann Intern Med; 111: 918-31, 1989.
- CAVALCANTIA, J. H. F., OLIVEIRA G. M., SARAIVAA K. D. C, TORQUATO, J. P. P., I. MAIAB, G., MELOA,D. F., COSTA, J. H. **Identification of duplicated and stress-inducible Aox2b gene co-expressed with Aox1 in species of the Medicago genus reveals a regulation linked to gene rearrangement in leguminous genomes.** Journal of Plant Physiology 170: 1609– 1619, 2013.
- DANIELA P. T. THOMAZELLA ;PAULO JOSE´ P.L. TEIXEIRA;HALLEY C. OLIVEIRA;ELZIRA E. SAVIANI;JOHANA RINCONES;ISABELLA M. TONI;OSVALDO REIS, ODALYS GARCIA, LYNDEL W. MEINHARDT, IONE SALGADO; GONÇALO A. G. PEREIRA. **The hemibiotrophic cacao pathogen Moniliophthora perniciosa depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development.** New Phytologist, 11 February 2012.
- DEMASI AP ; PEREIRA, G. A. G. ; NETTO, L. E. S. **Cytosolic thioredoxin peroxidase is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria.** FEBS Letters, v. 509, p. 430-434, 2001.
- DIAS, L.A.S. (org). **Melhoramento genético do cacaueiro.** Viçosa: FUNAPE/UFG, pg. 578,2001.
- DI MAURO S., Rustin P. **A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases.** Biochimica et Biophysica Acta 1792 1159–1167, 2009.
- EVANS, H. C., **Pleomorphism in Crinipellis-Perniciosa, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa.** Transactions of the British Mycological Society 74: 515-523, 1980.
- EL-KHOURY R., DUFOUR E., RAK M., RAMANANTSOA N., GRANDCHAMP N., CSABA Z., DUVILLIE B., BE´ NIT P., GALLEGGO J., GRESSENS P., SARKIS C.Y., JACOBS H. T., RUSTIN P. **Alternative Oxidase Expression in the Mouse Enables Bypassing Cytochrome c Oxidase Blockade and Limits Mitochondrial ROS Overproduction.** PLOS Genetics. Vol: 9 , 2013.
- ELHAFEZ D., MUCHA M.W., CLIFTON R., SOOLE KL., DAY D.A AND WELAN

J. **characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: intraorganelle location and expression.** *Plant Cell Physiol* 47, 43-54,2006.

FAO. Production Yearbook, v.54, 2000. Rome, 2002.

FIORAVANTI, C. A vassoura varrida. **Técnicas simples mostram como recuperar as plantações de cacau.** Revista Pesquisa FAPESP. n. 128. Outubro 2006

FENG, H., D. GUAN., SUN, K., WANG, Y., ZHANG, T., WANG, R. **Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses.** *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013.

FISHER A.B; DODIA, C; MANEVICH, Y.; CHEN, J –W. & FEINSTEIN, S.I. **phospholipid hydroperoxidases are substrates for non-selenium glutathione peroxidase.** *J. Biol. Chem*, 274; 21326-21334.

GIAEVER, G.; CHU, A.M.; NI, L. ET AL. **Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome.** *Nature*, v. 418, p. 387-391, 2002.

GARCIA, O., MACEDO. J. A. N., TIBURCIO, R., ZAPAROLLI, G., RICONES, J., BITTENCOURT, L. M. C., CEITA, G. O., MICHELI, F., GESTEIRA, A., MARIANO, A. C., SCHIAVINATO. M. A., MEDRANO, F, J., MEINHARDT. L.W., PEREIRA, G. A. A., CASCARDO, J. **Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*.** *Mycological research*, 3: 443–455,2007.

GANCEDO J. M. **yeast Carbon Catabolite Repression.** *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun; 62(2): 334–361,1998.

GASSNER, G. T., AND S. J. LIPPARD. **Component interactions in the soluble methane monooxygenase system from *Methylococcus capsulatus* (Bath).** *Biochemistry* 38: 12768-12785, 1999.

GESTEIRA, A., MICHELI, F., CARELS., N., DA SILVA, A.C., GRAMACHO, K.P., SCHUSTER, I., MACÊDO, JN., PEREIRA, G.A., CASCARDO, J.C. **comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*.** *Annals of botany*, 100: 129-140,2007.

GEORGOPAPADAKOU N.H.; J.S. TKACZ. **The fungal cell wall as a drug target.** *Trends Microbiology*. v. 3, n. 3: p. 98104, 1995.

GOMES, C. M., G. J. LE, A. V. XAVIER, AND M. TEIXEIRA. **Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase?** *Chembiochem*. 2: 583-587, 2001.

- GRIESHABER, M. K., AND S. VOLKEL. **Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide**. *Annu.Rev.Physiol* 60: 33-53,1998.
- GILBERT, H.F., MC LEAN, V.M. **Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange**. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 63: 69-172, 1990.
- GREG C. VANLERBERGHE. **Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants**. *Int. J. Mol. Sci.*,vol: 14, 6805-6847, 2013.
- HEINICKE, S.; LIVSTONE, M.S.; LU, C. **The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): A Comparative Genomics Analysis Tool for Biologists**. *PLoS ONE*, v. 2, n. 8, p.766, 2007.
- HALLIWELL, B. **The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system**. *Haemostasis*; 23(suppl 1): 118-26, 1993.
- Halliwell, B. & gutteridge, J.M.C. **Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, reapi, senescence and death**, In: Halliwell; B.; e Gutteridge; J.M.C. (Ed.), **Free radicals in baiology and Medicine**, Fourth edition oxford: oxford university press,p. 187-267,2007.
- HOFMANN,B.; HECHT, H.J. & FLOHE, L. **peroxiredoxins**. *Biol.Chem.*, 383: 347-364.
- HASSAN, R. Y.A., BILITEWSKI, U. **Direct electro chemical determination of *Candida albicans***. *activity Biosensors and Bioelectronics* 49: 192–198, 2013.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Update of the annual forecasts of production and consumption and estimates of production levels to achieve equilibrium in the world cocoa market as of 21 may 2009. Moscow: ICCO, 2009. (Executive Committee. EX 136/7).
- JOSEPH-HORNE, T D. W. HOLLOMON; P. M. WOOD. **Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components**. *Biochim.Biophys.Acta*,**1504**: 179-195, 2001.
- KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase: **molecular biology and potencial use as biopesticides**. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 27, n. 11, p. 887900, 1997.
- MEINHARDT, L.W; RINCONES, J.; BAILEY, BA.; AIME, MC.; GRIFFITH, GW.; ZHANG, D.; PEREIRA, GA. ***Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom diasease of cacao what's new from this old foe?**

mol.plant pathol. **9**, 577-588,2008.

MUSE, R. B., H. A. COLLIN, S. ISAAC, K. HARDWICK. **Effects of the fungus *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L).** Plant Pathology, 45: 145-154, 1996.

MONDEGO, J. M., CARAZZOLLE, M. F., COSTA, G. G., FORMIGHIERI, E. F., PARIZZI, L. P., RINCONE, S. J., COTOMACCI, C., CARRARO, D. M., CUNHA, A. F., CARRER, H., VIDAL, R. O., ESTRELA, R. C., GARCÍA, O., THOMAZELLA, D.P.T., DE OLIVEIRA, B.V., PIRES, A. B., RIO, M. C., ARAÚJO, M. R., DE MORAES, M. H., CASTRO, L. A., GRAMACHO, K. P., GONÇALVES, M. S., NETO, J. P., NETO, A. G., BARBOSA, L. V., GUILTINAN, M. J., BAILEY, B. A., MEINHARDT, L. W., CASCARDO, J. C., PEREIRA, G. A. **A genome survey of *Moniliophthora pernicios* gives new insights into Witches' Broom Disease of cação.** BMC. Genomics 9. 548,2008.

MEEUSE, B.J.D. **Thermogenic respiration in aroids.** Ann. Rev. Plant Physiol., v. 26, 117–126, 1975.

MCDONALD, A. E. **Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed 'cyanide-resistant' terminal oxidase.** Functional Plant Biology 35: 535-552, 2008.

MALLOA N., LAMASB J., LEIROA J. M. **Evidence of an Alternative Oxidase Pathway for Mitochondrial Respiration in the Scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*.** Protist, Vol. 164, 824–836, 2013.

M. DEMASI, R. SHINGARPURE, K.J.A. DAVIES. Arch. Biochem. Biophys. 389 254–263, 2001.

MEIER, I. C., ANGERT, A., FALIK, O., SHELEF, O. RACHMILEVITCH, S. **Increased root oxygen uptake in pea plants responding to non-self neighbors.** Planta, vol. 238, 577–586, 2013.

MLEJNEK, P. **Cytokinin-induced cell death is associated with elevated expression of alternative oxidase in tobacco BY-2 cells.** Protoplasma vol. 250,1195–1202, 2013.

MAGNANI, T., F. M. SORIANI, V. D. MARTINS, A. C. POLICARPO, C. A. SORGI ET AL. **Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages.** J.Bioenerg.Biomembr, 2009.

MCDONALD, A. E., AND G. C. VANLERBERGHE. **Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase.** Comparative Biochemistry and Physiology

D-Genomics & Proteomics 1: 357-364, 2006.

NARGANG, F. E., KELLY ADAMES, RÜB, C., CHEUNG, S., EASTON, N., NARGANG, C. E. CHAE, M. S. **Identification of Genes Required for Alternative Oxidase Production in the *Neurospora crassa* Gene Knockout Library.** genetics Vol. 2, 1345-1356, 2012.

NEIMANIS, K. STAPLES J. F., HÜNER, N. P.A., MCDONALD . A. **Identification, expression, and taxonomic distribution of alternative oxidases in non-angiosperm plants.** Gene 526: 275–286, 2013.

OLIVEIRA, LUZ., EVANS, H. C., STALEPERS, J. A., SAMSON, R. A. BENNY, G. L. **“On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America”.** Canadian Journal of Botany 56:2528-2532, 2005.

OLIVEIRA, B. M. ; PIROVANI, C. P. ; DIAS, C. V. ; SANTOS JUNIOR, M. C. ; HORACIO JUNIOR, B. T. ; SOUZA, C. S. ; UETANABARO, A. P. T. ; TARANTO, A. G. ; LOPES, M. A. . **Knowledge Discovery in Genome Database: The chitin metabolic pathway in *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer.** In: Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computacional biology, 2005, Rio de Janeiro. Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computacional biology. Rio de Janeiro : epapers, v. 1. p. 122139, 2005.

OLSEN, L. R.; RODERICK, S. L. **Structure of *Echerichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites.** Biochemistry, n. 40, p. 19131921, 2001.

PEREIRA, J. L., A. RAM, J. M. FIGUEREIDO, AND L. C. DE ALMEIDA. **1St Record on Presence of Witches-Broom Disease in the Principol Cocoa Producing Area of Brazil.** *Turrialba* 39: 459-461, 1989

PURDY, L. H., AND R. A. SCHMIDT, **STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management.** Annu.Rev.Phytopathol. 34: 573-594, 1996.

PURDY, L. H. **Fungal Disease of Cacao.** Disponível em: <http://www.cabicommodities.org/Acc/ACC/c/PDFFiles/WBPD/Ch1.pdf>. Acesso em: 25 jan 2014.

PATRICK, G. L. **Drug discovery: finding a lead. In_____: An introduction to medicinal chemistry.** 4. ed. Oxford: New York: Oxford University Press, p. 187212, 2009.

REANKAR, S. J.; GRAYBILL, R., MCGINNIS, M.R.; FALLER, H. Antifungal therapy. In: ANALISSIE, E. J.; Clinical Micology. Churchill & Livingstone,

New York, 2003.

- RINCONES, J., SCARPARI, L.M., CARAZZOLLE, MF., MONDEGO, J.M., FORMIGHIERI, E.F., BARAU, J.G., COSTA, G.G., CARRARO, D.M., BRENTANI, H.P., VILAS-BOAS, L.A., DE OLIVEIRA, B.V., SABHA, M., DIAS, R., CASCARDO, J.M., AZEVEDO, R.A., MEINHARDT, L.W., PEREIRA, G.A. **Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen *Moniliophthoraperniciosa***. Mol.Plani Microbe Internet.,21, 891-908, 2008.
- SCARPARI, L.M., MEINHARDT, L.W., MAZZAFERA, P., POMELLA, AW., SCHIAVINATO, M.A., CASCARDO, J.C., PEREIRA, G.A. **Biochemical changes during the developntent of witches' broom: the most importam disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa***". J Exp.Bot. 56, 865-877, 2005.
- SOLORZANO, G. R. **Factores ambientales involucrados en la producción de basidiocarpos y la diseminación de basidiosporos de *Marasmius perniciosus* Stahel**. Tesis Ing. Agr. Ecuador. Universidad de Manabí,1977.
- STRATHERN, J.N.; JONES, E.W. AND BROACH, J.R. **The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces***. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1981.
- SLUSE, F.E., JARMUSZKIEWICZ, W. **Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role**. Braz J Med Biol Res. Jun;31(6):733-47, 1998.
- STANIC, M., ZAKRZEWSKA J., HADZIBRAHIMOVIC, M., MILAN ZIZIC , MARKOVIC, Z., VUCINIC, Z., ZVI, M. **Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism**. Research in Microbiology 164: 770-778, 2013.
- SLUSE, F.E. , JARMUSZKIEWICZ, W. **Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role**. Biological Research vol: 31, 733-747,1998.
- SELLECK, S. B. AND MAJORS, J. E. **In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein**. *Molecular and Cellular Biology* 7, 3260–3267, 1987.
- TAKAYA, N., YAMAZAKI, D., HORIUCHI, H., OHTA, A., TAKAGI, M. **"Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization"**. Microbiology, n. 144, p. 26472654, 1998.
- TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. Microbiologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- TUDELLA, V.G.; CURTI, C.; SORIANI, F.M.; SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A. **In situ evidence of an alternative oxidase and an uncouling protein in**

the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. The international Journal of Biochemistry e Cell Biology, v. 36, p. 162–172, 2003.

TING XU, YA-TING WANG, WU-SHENG LIANG, FEI YAO, YONG-HONG LI, DIAN-RONG LI. **Involvement of Alternative Oxidase in the Regulation of Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the Fungicides Azoxystrobin and Procymidone** Journal of Microbiology VOL. 51, NO. 3, PP. 352–358, 2013.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K. D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D. & FLOHÉ, L. **diversity of glutathione peroxidases.** Methods Enzymol. 252: 38-53.

WATLING, J.R., ROBINSON, S.A., SEYMOUR, R.S. **“CONTRIBUTION OF THE ALTERNATIVE PATHWAY TO RESPIRATION DURING THERMOGENESIS IN FLOWERS OF THE SACRED LOTUS”.** Nelumbo nucifera. Plant physiol 140:1367-1373,2006.

WINZELER, E. A., SHOEMAKER, D. D., ASTROMOFF, A. *et al.* Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. **Science**, v. 285, p. 901, 2011.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. **Pathogenic races of *Crinipellis perniciosa*? In International Cocoa Research Conference.** 8, 1981. Proceedings. Cartagena, Colombia, 1981. p. 365-370,1982.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. 620p. 1985.