



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

JANNE KEILA SOUSA MORAIS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA TOXINA DA
SOJA (SBTX) COMO UMA FERRAMENTA
CONTRA FUNGOS**

FORTALEZA – CEARÁ

2010

JANNEKEILA SOUSA MORAIS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA TOXINA DA SOJA (SBTX) COMO
UMA FERRAMENTA CONTRA FUNGOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Ilka Maria
Vasconcelos

FORTALEZA – CEARÁ
2010

M825p Morais, Janne Keila Sousa
Potencial biotecnológico da toxina da soja (SBTX) como uma
ferramenta contra fungos / Janne Keila Sousa Morais, 2010.
171 f. :il. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Área de concentração: Bioquímica
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências.
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular. Fortaleza, 2010.

1. Soja 2. Fungos fitopatogênicos 3. *Cândida albicans* I. Vasconcelos,
Ilka Maria (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em
Bioquímica III. Título

CDD 574.192

JANNEKEILA SOUSA MORAIS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA TOXINA DA SOJA (SBTX) COMO
UMA FERRAMENTA CONTRA FUNGOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica
Vegetal.

Tese aprovada em: 29/10/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
(Orientadora)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a. Dr.^a. Valdirene Moreira Gomes
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, (UENF)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza
UNIFOR

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PEQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Janne Keila Sousa Morais

*À minha querida orientadora, Ilka
Maria Vasconcelos, pelo seu
apoio, incentivo e carinho
constantemente em minha caminhada
científica.*

*Como prova de minha enorme
admiração e gratidão,
Dedico*

*À minha mãe Maria, minha
avó Antonieta, minha irmã
Jannaina e ao meu noivo
Philippe Dostert, por
compartilharem a beleza de
suas vidas ao meu lado,
Ofereço*

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se tornam golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.

Por isso, meu ardente desejo, é que
VOCÊ NUNCA DESISTA DE SEUS SONHOS”

Augusto Curry

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pela criteriosa orientação, dedicação, *carinho, compreensão e confiança* durante minha iniciação científica, mestrado e doutorado, além de ensinamentos fundamentais, conferindo a cada dia, maturidade à minha carreira científica.

Ao Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por sua constante contribuição para a execução deste trabalho, por sua incansável e agradável transmissão dos conhecimentos científicos, que levarei sempre comigo em minha jornada científica.

À Dra. Valdirene Moreira Gomes, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e ter contribuído constantemente para a execução deste trabalho.

Aos professores Dr. Thalles Barbosa Granjeiro e Dr. Renato Azevedo Moreira pela pronta disponibilidade em aceitar participar da banca examinadora, bem como pelas sugestões que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Dr. Rainer Jonas, Dr. Michael Weig e ao Dr. Oliver Bader por terem me recebido em seu país e em seus laboratórios, além do convívio alegre e pronta disponibilidade em contribuir para a execução deste trabalho.

À Dra. Maura da Cunha, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Ao Dr. Francisco Campos, pelos ensinamentos, apoio e amizade sempre demonstrados durante minha formação acadêmica.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na pessoa do pesquisador André Luís Lourenção, pelo fornecimento das sementes de soja utilizadas neste trabalho.

Aos estudantes do Laboratório de Fisiologia de Microorganismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Érica, Mariângela, Suzanna, Humberto e, em especial, aos amigos Isabela e André pelo companheirismo e apoio que contribuíram para a execução dessa tese.

Aos colegas Mayra, Vladimir, Fred, Hélio, Alexandra, Ana Lídia, Pedro, Rodolfo, Handerson, Davi, Camila, Luana, Davi Felipe, Martônio e Leide, pelo apoio e companheirismo sempre prestados.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos Mirella, Adelina, Hellen, Raquel Coelho, Daniel, Geórgia, Juliana, Henrique, Lucas, Vanessa e Paulo que com a amizade e convivência alegre tornaram tão agradável minha caminhada pelo *Laboratório de Toxinas Vegetais*.

Gostaria de agradecer em especial as estudantes Mariana e Raquel Rocha que estiveram ao meu lado na etapa final desse trabalho, torcendo a cada experimento concluído e compartilhando as decepções de um experimento furado.

As estudantes Rafaela Cordeiro, Rosana Campos e Lívia Xavier que durante suas passagens pelo Laboratório de Toxinas Vegetais contribuíram também pela realização desse trabalho.

De forma especial, agradeço ainda a alegria do convívio diário, apoio, carinho e preciosa amizade do meu "irmão científico" Hermógenes e da minha querida amiga Daniele que ao meu lado estiveram, principalmente, nos momentos finais de elaboração deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), pelos ensinamentos transmitidos e disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

Com carinho, agradeço à minha avó, Antonieta, que sempre me apoiou durante todos os momentos de minha vida e, de maneira muito especial, agradeço a minha querida mãe e a minha irmã, pelo inestimável amor e estímulo diário que me proporcionaram com suas palavras de incentivo, me dando força para viver as conquistas que faço em minha vida.

Enfim, agradeço a DEUS pelo dom da vida, amor incondicional e por ter colocado em meu caminho, durante essa fase de minha vida, meu amor Philippe Dostert, que através de sua alegria de viver, amor verdadeiro e presença constante, embora de tão longe, sempre motivou e apoiou meus anseios profissionais.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais-LABTOX**, sob a coordenação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) – através de concessão de bolsa de doutorado e de fomento à pesquisa.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO (RJ) – através de parceria experimental com o Laboratório de Fisiologia de Microorganismos sob a coordenação da Dra. Valdirene Moreira Gomes

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA DA UNIVERSIDADE DE GÖTTINGEN; ALEMANHA – através da parceria experimental sob a orientação do Prof. Dr. Michael Weig.

INWENT, ALEMANHA, através do apoio durante toda minha estadia na Alemanha sob a responsabilidade do Dr. Rainer Jonas.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CAPES, FUNCAP e FCPC (UFC) que contribuíram para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

RESUMO

A soja (*Glycine max*) é uma espécie de grande valor econômico para o Brasil dada a multiplicidade de uso de suas sementes na alimentação animal e indústria. Embora o Brasil seja o segundo maior produtor mundial de sementes, as perdas na produtividade em campo são ainda consideráveis, principalmente àquelas causadas por fungos fitopatogênicos, a despeito da existência de alternativas químicas para o controle dessas espécies e, de genótipos resistentes. Dessa forma, a busca por mecanismos naturais de resistência ambientalmente seguros é uma prática necessária para o controle de pragas e patógenos e melhoria na produtividade. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial biotecnológico da SBTX como uma ferramenta para o controle de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica, bem como investigar o mecanismo de ação pelo qual essa proteína exerce sua atividade. SBTX (44 kDa) foi capaz de interferir no crescimento de hifas do fungo *Cercospora kikuchii* já na concentração de 50 µgP/mL. Todavia, essa proteína não inibiu a germinação dos esporos do *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis sp.*, e *C. kikuchii* mesmo na concentração de 200 µgP/mL. Uma vez que *C. kikuchii* é um fungo que ataca folhas de soja, a presença de SBTX nesses órgãos foi avaliada. Nas folhas de plantas jovens, foram detectados $35,08 \pm 0,57$ µg de SBTX/mgP, ao passo que em folhas adultas o teor observado foi de $18,60 \pm 2,89$ µg de SBTX/mgP. SBTX foi induzida 24 horas após a injúria mecânica de folhas (passando de $35,08 \pm 0,57$ µg de SBTX/mgP para $209 \pm 2,38$ µg de SBTX/mgP), funcionando como uma proteína de defesa. Tendo em vista o potencial biotecnológico dessa proteína no controle de fungos fitopatogênicos, este trabalho também visou a elucidação do mecanismo de ação da SBTX, utilizando leveduras como modelo. SBTX (200 µgP/mL) inibiu o crescimento de *Candida albicans*, mas não de *Pichia membranifaciens* e *Candida parapsilosis*. Entretanto, foram observadas alterações morfológicas caracterizadas como pseudohifas em *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* promovidas por SBTX (400 µgP/mL). A agregação de células foi cerca de dez vezes maior em *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* após incubação com SBTX, quando comparada ao controle. Ademais, SBTX causou permeabilização de membrana nessas células guiadas por "SYTOX Green" e inibiu em cerca de 27% a acidificação do meio estimulada por glucose em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Células de *P. membranifaciens* tratadas com SBTX (400 µg/mL) apresentaram disrupção na parede celular, bem como condensação, retração do citoplasma fortemente granulado, além do aumento da vacuolização e perda da estrutura normal e do conteúdo citoplasmático. Ao avaliar o padrão de expressão gênica de células de *C. albicans*, foi constatada a capacidade da SBTX em induzir a expressão de genes envolvidos em vários processos celulares, incluindo transporte de moléculas, metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, ciclo e respiração celular, além de genes envolvidos em respostas às drogas e ao estresse. Dentre os genes induzidos, deve ser destacado o *TUP1*, que codifica um fator de transcrição capaz de reprimir a formação de pseudohifas, justificando, assim, a ausência dessas estruturas em *C. albicans*, mesmo em condições de estresse impostas pela SBTX. O mecanismo de inibição de SBTX em *C. albicans* aqui proposto é que a toxina pode ter atravessado a parede celular, acionado o sensor de glucose Hgt4 presente na membrana celular, comprometendo, assim, a sua assimilação, levando *C. albicans* a ativar outras rotas metabólicas como gliconeogênese, β-oxidação e via de Leloir, além de ter interferido nos níveis de outros componentes essenciais para a célula, tais como histonas, e RNA e de induzido a formação de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: *Glycine max*, toxina da soja, SBTX, defesa vegetal, Fungos fitopatogênicos, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is a species of great economic value for Brazil given the multiplicity of use of its seeds in animal feed and industry. Although Brazil is the second largest producer of seeds, the losses in productivity in the field are still considerable, especially those caused by pathogenic fungi, despite of the existence of alternatives to chemical control of these species and resistant genotypes. Thus, the search for natural mechanisms of resistance is an environmentally safe practice needed to control pests and pathogens and to improve the productivity. The present study aimed to evaluate the biotechnological potential of SBTX as a tool to control pathogenic fungi of agronomic importance, and to investigate the mechanism of action by which this protein exerts its activity. SBTX (44 kDa) was able to interfere with the growth of hyphae of the fungus *Cercospora kikuchii* at concentration of 50 µgP/mL. Nevertheless, this protein did not inhibit spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis sp.*, and *C. kikuchii* even at a concentration of 200 µgP/mL. Since *C. kikuchii* is a fungus that attacks soybean leaves, the presence of SBTX in these organs was evaluated. In leaves of young plants were found 35,08 ± 0,57 µg of SBTX/mgP, whereas in mature leaves the content observed was 18,60 ± 2,89 µg of SBTX/mgP. SBTX was induced 24 hours after mechanical injury of leaves (from 35,08 ± 0,57 µg of SBTX/mgP to 209 ± 2.38 µg of SBTX/mgP), functioning as a defense protein. In view of the biotechnological potential of this protein in controlling pathogenic fungi, the present study also aimed to elucidate the mechanism of action of SBTX, using yeast as model. SBTX (200 µgP/mL) inhibited the growth of *Candida albicans*, but not the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Candida parapsilosis*. However, morphological changes characterized as pseudohyphae were observed in *P. membranifaciens* and *C. parapsilosis*, promoted by SBTX (400 µgP/mL). The aggregation of cells was about ten times higher in *P. membranifaciens* and *C. parapsilosis* after incubation with SBTX compared to control. Moreover, SBTX caused membrane permeabilization in these cells guided by SYTOX Green and inhibited by about 27% the acidification stimulated by glucose in *Saccharomyces cerevisiae* cells. Cells of *P. membranifaciens* SBTX treated (400 mg/ mL) presented cell wall disruption, condensation and shrinkage of cytoplasm, in addition to increased vacuolation and loss of normal structure and cytoplasm content. Assessing the pattern of gene expression in cells of *C. albicans* was found in the ability of SBTX to induce the expression of genes involved in various cellular processes, including transport of molecules, metabolism of carbohydrates and amino acids, cycle and cellular respiration, as well as genes involved in responses to drugs and stress. Among the induced genes, must be reported to *TUP1*, which encodes a transcription factor capable of suppressing the formation of pseudohyphae, justifying the absence of such structures in *C. albicans*, even under stress conditions imposed by SBTX. The mechanism of inhibition of SBTX in *C. albicans* proposed here is that the toxin may have crossed the cell wall, activates the glucose sensor Hgt4 present in the cell membrane and compromised, its assimilation, stimulating *C. albicans* to activate other metabolic pathways such as gluconeogenesis, beta-oxidation and Leloir pathway, and also interfered in the levels of other essential components to the cell, such as histones and RNA and induced the formation of reactive oxygen species.

Keywords: *Glycine max*, soybean toxin, SBTX, plant defense, phytopathogenic fungi, *Candida albicans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX	Alternativa oxidase
AS	Ácido salicílico
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro azul tetrazolio
CM	Carboximetil
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CT	Ciclo de Limiar
Cyn3	Cianina3
Cyn5	Cianina5
DEAE	Dietilaminoetil
DL₅₀	Dose capaz de matar 50% dos animais testados
dNTP	Desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTC, dTTP)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima
ESTs	Etiquetas de Seqüência Transcritas
ET	Etileno
FAO	Organização para a Agricultura e Alimentação
GmTX	Toxina de <i>Glycine max</i>
HR	Resposta de hipersensibilidade
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IAC	Instituto Agrônômico de Campinas
JA	Ácido jasmônico
LTPs	Proteínas transferidoras de lípidos
MALDI	Ionização/Dessorção de matriz assistida por laser
Mo-CBP₃	Proteína ligante à quitina de sementes de <i>Moringa oleifera</i>
ORFs	<i>Open Reading Frames</i> - janela de leitura aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSMF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRs	Proteína relacionada à patogênese
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> - espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	Amplificação quantitativa de transcritos reversos

SBTX	Toxina da Soja
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SYTX	Soyatoxina
TEMED	N,N, N'. N'-tetrametiletenodiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
YPD	Caldo de Levedura Dextrose

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1		Página
FIGURA 01.	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. Aspectos da planta, vagens e sementes.....	26
FIGURA 02.	Áreas destinadas ao plantio de soja desde o ano de 1996 a 2010 e expectativa para o período 2011 a 2019.....	28
FIGURA 03.	Análise de expressão diferencial de genes por microarranjos de DNA	43
CAPÍTULO 2		Página
FIGURA 01.	Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX).....	56
FIGURA 02.	Plantas de soja (cultivar BRS Pala) em casa de vegetação.....	60
FIGURA 03.	Imagens das plantas de soja utilizadas no experimento de indução por injúria mecânica.....	62
FIGURA 04.	Espectrometria de massas de SBTX	66
FIGURA 05.	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	67
FIGURA 06.	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Phomopsis sp</i>	68
FIGURA 07.	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Cercospora kikuchii</i>	69
FIGURA 08.	Teste de inibição do crescimento de <i>C. kikuchii</i> em meio líquido	70
FIGURA 09.	Níveis de SBTX ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína extraída) detectados em folhas jovens e adultas de soja (estádio V4 e 50 DAP) obtidos através da técnica de ELISA indireto	72

FIGURA 10.	Eletrforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos totais de folhas de soja (R5) submetidas ou não à injúria mecânica.....	73
FIGURA 11.	Aumento nos níveis teciduais de SBTX através de indução por injúria mecânica.....	75

CAPÍTULO 3		Página
FIGURA 01.	Esquema de amplificação e marcação de cRNA	96
FIGURA 02.	Gráfico de amplificação em um experimento de qPCR evidenciando o CT “Threshold cycle”	100
FIGURA 03.	Desenvolvimento de células de <i>C. albicans</i> (A), <i>P. membranifaciens</i> (B) e <i>C. parapsilosis</i> (C) em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”) na presença de SBTX em diferentes concentrações.....	102
FIGURA 04.	Microscopia de varredura de células de leveduras na presença de SBTX.....	103
FIGURA 05.	Células da levedura <i>C. parapsilosis</i> visualizadas em microscopia de fluorescência.....	104
FIGURA 06.	Células da levedura <i>P. membranifaciens</i> visualizadas em microscopia de fluorescência.....	105
FIGURA 07.	Células da levedura <i>C. albicans</i> visualizadas em microscopia de fluorescência.....	106
FIGURA 08.	Teste de inibição da acidificação em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”) estimulado por glicose em levedura <i>S. cerevisiae</i> por SBTX.....	108
FIGURA 09.	Microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>P. membranifaciens</i> e <i>C. albicans</i> cultivadas na ausência (A, B) e na presença (C, D, E) da Toxina da Soja (SBTX, 400 µg/ml).....	109
FIGURA 10.	Curvas de crescimento de <i>C. albicans</i> SC5314 em meio líquido (Sabouraud) na presença de SBTX em diferentes concentrações.....	110

FIGURA 11.	Amostras de RNA total de <i>C. albicans</i> SC5314.....	112
FIGURA 12.	Imagem da hibridização da lâmina de microarranjo de DNA, após varredura por Scanner	113
FIGURA 13.	Gráficos M x A representando a normalização dos dados pelo algoritmo de LOWESS.....	114
FIGURA 14.	Categorização funcional das ORF`s (Open Reading Frames) immobilizadas nas lâminas de oligonucleotídeos com base no banco de dados www.candidagenoma.org . Genes induzidos <i>C. albicans</i> SC5314 incubada por 18 horas com SBTX	115
FIGURA 15.	Categorização funcional das ORF`s (Open Reading Frames) immobilizadas nas lâminas de oligonucleotídeos com base no banco de dados www.candidagenoma.org . Genes induzidos em <i>C. albicans</i> SC5314 incubada por 20 horas com SBTX.....	116
FIGURA 16.	Curva de crescimento de <i>C.albicans</i> selvagem (A), <i>C.albicans dTUP1</i> (B) e <i>C. albicans dRIM101</i> (C) na presença de SBTX e na ausência da toxina.....	129
FIGURA 17.	Cepas da levedura <i>C. albicans</i> visualizadas em microscopia óptica na ausência de SBTX.....	130
FIGURA 18.	Esquemas representativos ilustrando os sensores que foram ativados em <i>C. albicans</i> por SBTX.....	138
FIGURA 19.	Esquema representativo ilustrando o efeito de SBTX no crescimento de <i>C. albicans</i> por SBTX.....	142

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1		Página
TABELA 01.	Principais doenças fúngicas da parte aérea da soja e órgãos da planta agredidos	31
TABELA 02.	Estádios de desenvolvimento da soja.....	
TABELA 03.	Classes de proteínas antifúngicas e possível mecanismo de ação.....	32
TABELA 04.	Comparação das propriedades bioquímicas e biológicas de <i>Glycine max</i> toxina (GmTX) ^a , Soyatoxina (SYTX) ^b e toxina da soja (SBTX).....	36 47
CAPÍTULO 3		Página
TABELA 01.	Seqüências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados para (RT- qPCR)	98
TABELA 02.	Categorização funcional em percentagem dos genes induzidos em <i>C. albicans</i> por SBTX por 18 e 20 horas.....	117
TABELA 03.	Tabela de categorização funcional de alguns genes que foram induzidos em células de <i>C. albicans</i> SC5314 incubadas com SBTX por 18 horas	121
TABELA 04.	Tabela de categorização funcional de alguns genes que foram reprimidos em células de <i>C. albicans</i> SC5314 incubadas com SBTX por 18 horas.....	123
TABELA 05.	Tabela de categorização funcional de alguns genes que foram induzidos em células de <i>C. albicans</i> SC5314 incubadas com SBTX por 20 horas	124
TABELA 06.	Tabela de categorização funcional de alguns genes que foram reprimidos em células de <i>C. albicans</i> SC5314 incubadas com SBTX por 20 horas.....	127
TABELA 07.	Confirmação da expressão gênica diferencial em microarranjos usando PCR quantitativo.....	128

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1		Página
1. REVISÃO DE LITERATURA.....		25
1.1 Evolução e Importância Sócio-Econômica da Cultura da Soja		
[<i>Glycine Max</i> (L.) Merr.] no Brasil.....		25
1.2 Avanços da Cultura da Soja		29
1.3 Limitações da Cultura da Soja no Brasil		30
1.3.1 Doenças Fúngicas.....		30
1.4 Participação de Proteínas no Mecanismo de Defesa de Plantas		
contra Fungos.....		33
1.4.1 Mecanismo de Ação de Proteínas Antifúngicas.....		35
1.4.1.1 Proteínas Antifúngicas que Atuam na Parede Celular		35
1.4.1.2 Proteínas Antifúngicas que Atuam na Membrana Celular.....		37
1.4.1.3 Proteínas Antifúngicas que Atuam em Alvos Intracelulares.....		38
1.5 Potencial Biotecnológico de Proteínas Vegetais contra Fungos		39
1.6 Ferramentas Biológicas e Moleculares para Estudo de		
Mecanismos de Ação Antifúngico.....		40
1.6.1 Leveduras.....		41
1.6.2 Microarranjos de DNA – Uma Ferramenta poderosa na Análise		
da Expressão Gênica.....		41
1.6.3 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....		44
1.7. Toxinas Protéicas de Sementes de Soja e Sua Atuação na		
Defesa Vegetal.....		45
1.7.1 Toxina da Soja, SBTX.....		46
2. HIPÓTESES.....		49
CAPÍTULO 2		Página
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....		51

2. OBJETIVOS.....	53
2.1 Gerais.....	53
2.2 Específicos.....	53
3. MATERIAIS.....	54
3.1 Sementes de soja	54
3.2 Fungos fitopatogênicos	54
3.3 Animais experimentais.....	54
3.4. Reagentes e soluções	55
4. MÉTODOS.....	56
4.1 Purificação e Avaliação da Toxicidade da SBTX	56
4.1.1 Determinação da Pureza da SBTX por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) e Espectrometria de Massas	56
4.2 Avaliação da Atividade Antifúngica da SBTX <i>in vitro</i>	58
4.2.1 Obtenção dos Conídios.....	58
4.2.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Conídios.....	58
4.2.3 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido.....	58
4.3 Detecção de SBTX em Folhas de Plantas Jovens e Adultas de Soja	59
4.3.1 Produção de Anticorpos Policlonais Anti-SBTX	59
4.3.2 Obtenção de Plantas Jovens de Soja e Produção dos Extratos Protéicos de Folhas	60
4.3.3 Indução da Expressão da SBTX em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica.....	62
4.3.4 Detecção e Quantificação de SBTX Através de Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA).....	64
4.4 Análise estatística	65
5. RESULTADOS.....	66
5.1 Purificação, Avaliação da Toxicidade e Determinação da Pureza da SBTX por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) e Espectrometria de Massas.....	66
5.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Conídios	66

5.3 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido.....	66
5.4 Detecção de SBTX em Folhas de Plantas Jovens e Adultas de Soja	72
5.5 Indução da Expressão da SBTX em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica	72
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	83
8. PERSPECTIVAS DO CAPÍTULO.....	84

CAPÍTULO 3	Página
------------	--------

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....	86
2. OBJETIVOS.....	88
2.1 Gerais.....	88
2.2 Específicos.....	88
3. MATERIAIS.....	89
3.1 Sementes de Soja.....	89
3.2 Fungos Leveduriformes	89
3.3 Kits e Soluções para os Ensaios de Microarranjos de DNA e qPCR	89
4. MÉTODOS.....	91
4.1 Extração e Purificação da SBTX	91
4.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras.....	91
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	91
4.4 Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras.....	92
4.5 Ensaio de Acidificação do Meio Estimulado por Glicose.....	92
4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão	93
4.7 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de <i>Candida albicans</i> SC5314.....	93
4.8 Análise do Padrão de Expressão Gênica de Células de <i>C. albicans</i> SC5314 Incubadas com a SBTX Através da Técnica de	

Microarranjos de DNA.....	94
4.8.1 Extração do RNA Total de Células de <i>C. albicans</i> SC5314 Tratadas com SBTX.....	95
4.8.2 Marcação do cRNA.....	96
4.8.3 Hibridização do cRNA nas Lâminas de "Arrays".....	96
4.8.4 Extração, Normalização e Análise dos Dados.....	98
4.8.5 Validação dos Genes por Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-qPCR).....	98
4.9 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de <i>C.</i> <i>albicans dTUP1</i> e <i>C. albicans dRIM101</i>.....	100
5. RESULTADOS.....	102
5.1 Extração e Purificação da SBTX.....	102
5.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras.....	102
5.3 Análise da Morfologia das Células de Leveduras Tratadas com SBTX por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	102
5.4 Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras.....	102
5.5 Ensaio de Acidificação do Meio Estimulado por Glicose.....	108
5.6 Análise de Alterações Estruturais das Células de Leveduras Tratadas com SBTX por Microscopia Eletrônica de Transmissão	108
5.7 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de <i>C.</i> <i>albicans</i> SC5314.....	108
5.8 Análise do Padrão de Expressão Gênica de Células de <i>C.</i> <i>albicans</i> SC5314 Incubadas com a Toxina da Soja Através da Técnica de Microarranjos de DNA.....	112
5.8.1 Extração do RNA Total de Células de <i>C. albicans</i> SC5314 Tratadas com SBTX	112
5.8.2 Marcação e Hibridização do cRNA nas Lâminas de "Arrays"	112
5.8.3 Extração, Normalização e Análise dos Dados.....	112
5.8.4 Validação dos Genes por Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-qPCR).....	113
5.9 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de <i>C.</i>	

<i>albicans</i> dTUP1 e <i>C. albicans</i> dRIM101.....	118
6. DISCUSSÃO.....	132
7. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	145
8. PERSPECTIVAS.....	146
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
10. ANEXOS.....	170

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TÉORICA

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Evolução e Importância Sócio-Econômica da Cultura da Soja [*Glycine Max* (L.) Merr.] no Brasil

A soja (FIGURA 01) chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882, pelo então professor da Escola de Agronomia da Bahia, Gustavo Dutra, que realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares introduzidas daquele país (SHURTLEFF; AOYAGI, 2009).

Em 1891, testes de adaptação de cultivares semelhantes aos conduzidos por Dutra na Bahia foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, Estado de São Paulo. A soja no Brasil dessa época era estudada como forrageira, assim como nos Estados Unidos, produzindo mais grãos para consumo de animais das propriedades rurais do que como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais (SHURTLEFF; AOYAGI, 2009).

O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Entretanto, somente a partir dos anos 40 ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS como uma área cultivada de 640 hectares, produção de 450 toneladas e rendimento de 700 kg/ha. Nesse mesmo ano, instalou-se a primeira indústria processadora de soja do País (Santa Rosa, RS) e, em 1949, com uma produção de 25.000 toneladas, o Brasil figurou, pela primeira vez, como produtor de soja nas estatísticas internacionais (EMBRAPA, 2010).

O explosivo crescimento da produção de soja no Brasil, de quase 260 vezes no transcorrer de apenas quatro décadas, determinou uma cadeia de mudanças sem precedentes na história do país. A soja, inicialmente auxiliada pelo trigo, foi a grande responsável pelo surgimento da agricultura comercial no Brasil. Também, ela apoiou ou foi a grande responsável pela aceleração da mecanização das lavouras brasileiras, modernização do sistema de transportes, expansão da fronteira agrícola, profissionalização e incremento do comércio internacional, modificação e enriquecimento da dieta alimentar dos brasileiros, aceleração da urbanização do País, interiorização da população brasileira, tecnificação de outras culturas (destacadamente a do milho), bem como impulsionou e interiorizou a agro-indústria nacional, patrocinando a expansão da



FIGURA 01 - *Glycine max* (L.) Merr. Aspectos da planta, vagens e sementes.

Fonte: EMBRAPA, 2010.

avicultura e da suinocultura brasileiras (EMBRAPA, 2004).

Atualmente, o Brasil é responsável por 27,1% da produção mundial de soja, sendo o segundo maior produtor dessa oleaginosa, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que participa com 38,2% da produção mundial (EMBRAPA, 2010).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, o cultivo da soja ocupa no país uma área de 23,47 milhões de hectares, sendo a espécie com maior extensão de plantio. Sua produção nacional, safra 2009/10, atualmente estimada em 68,47 milhões de toneladas, é 19,8% (11,31 milhões) superior as 57,17 milhões de toneladas colhidas na safra anterior. Ademais, as exportações brasileiras são estimadas em 29,3 milhões de toneladas, 1,7% e 2,4% acima do último levantamento e da temporada 2008/09, respectivamente (CONAB, 2010). A receita estimada proveniente das exportações do complexo da soja de 2008 supera os 17 bilhões de dólares, representando mais de 10% do total exportado pelo país. Todavia, mais importante do que os benefícios diretos provenientes das exportações, são os benefícios indiretos derivados de sua extensa cadeia produtiva, que superam em mais de cinco vezes esse montante (CONAB, 2010).

Além disso, o cenário futuro da soja é muito positivo para Brasil. A área e a produção deverão crescer substancialmente, como consequência do incremento da demanda por carnes e biodiesel e à disponibilidade de mais de 100 milhões de hectares de terras aptas para a produção, apenas no ecossistema do Cerrado (AGNOL, 2009). Desta forma, projeta-se que a área semeada com soja passará dos atuais 23,47 milhões de hectares (2008/09) para 27,50 milhões de hectares em 2018/19 (FIGURA 02) (CÉLEBRES, 2010).

Um dos principais fatores que impulsionam e justificam a grande produção e utilização da soja é, sem dúvida alguma, o elevado valor nutricional de suas sementes. Basicamente, suas sementes são constituídos de 30 a 42% de proteínas, 30% de carboidratos e 18 a 20% de óleo (PARK *et al.*, 2002). Ademais, outros componentes presentes na soja, tais como minerais (ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, cobalto, fósforo e fosfato), vitaminas (tiamina e riboflavina), ácidos graxos essenciais (ácido linoléico e linolênico) e compostos bioativos (isoflavonas, saponinas, fitatos) fazem da soja uma fonte alimentar funcional e alternativa (EMBRAPA, 2010).

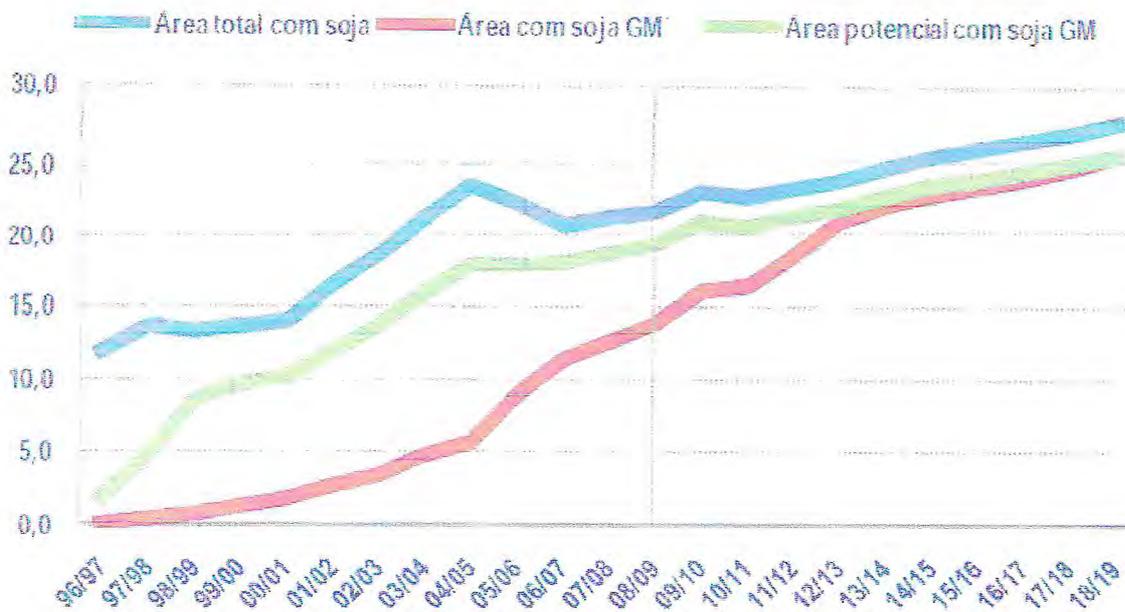


FIGURA 02 – Áreas destinadas ao plantio de soja desde o ano de 1996 a 2010 e expectativa para o período 2011 a 2019. Linha azul: área total com soja; linha vermelha: área com soja geneticamente modificada; linha verde: área potencial com soja geneticamente modificada. Fonte: Célebres, 2010.

1.2 Avanços da Cultura da Soja

Diante da necessidade mundial de buscar alternativas para proporcionar uma alimentação saudável, equilibrada e com menor custo, a soja é vista como uma excelente opção em decorrência de seu alto valor nutritivo, produtividade, disponibilidade de expansão e baixo custo.

Atualmente, a soja é a primeira espécie de leguminosa a ter seu genoma seqüenciado por completo (SCHMUTZ *et al.*, 2010). A partir desse processo de seqüenciamento, genes responsáveis por determinadas características poderão ser identificados e, com isso, melhores cultivares serão disponibilizadas para o produtor. Essas características podem ser, por exemplo, aumento na produtividade, incremento no conteúdo de óleo para produção de biodiesel, melhoria na digestibilidade para animais e humanos, melhoria da qualidade nutricional, redução de fitatos, tolerância à seca, resistência a pragas e a doenças específicas nas diferentes regiões onde a soja é cultivada (ROSSINI *et al.*, 1995).

Essa leguminosa tem também sido submetida a técnicas de melhoramento convencional a fim de torná-la mais produtiva, tolerante a estresse abiótico e resistente a ervas daninhas (ZARKADAS *et al.*, 1999). Algumas dessas novas variedades já apresentam uma diminuição nos fatores antinutricionais, tais como inibidores de tripsina (HAN; PARSONS; HYMOWITZ, 1991) e lectina (DOUGLAS; PARSONS; HYMOWITZ, 1999), aumento no teor de lisina (PARSONS; ZANG, 1997) e redução da alergenicidade (SAMOTO *et al.*, 1997).

No Brasil, a Embrapa e a Fundação Meridional lançaram neste ano as cultivares de soja BRS 294RR e BRS 295RR, que têm como grande diferencial a resistência ao glifosato (são cultivares com o gene *RR*) e o ciclo de maturação precoce. Estas cultivares associam características importantes para o mercado de soja, uma vez que a precocidade possibilita o segundo cultivo de verão e a semeadura mais cedo facilita, também, o manejo da ferrugem asiática da soja (EMBRAPA, 2010).

A EMBRAPA também lançou este ano a cultivar BRSGO-7560, resistente à ferrugem asiática. Vale ressaltar que a variedade resistente não é completamente imune e, ainda, apresenta lesões. Entretanto, a doença se desenvolve de uma forma mais lenta no campo. Esse fato, aliado à propriedade de ser uma variedade de ciclo precoce, permitirá ao agricultor plantar na época normal e colher mais

cedo, evitando a severidade da doença. Mesmo assim, o uso de fungicidas ainda será praticado, embora em uma menor escala (EMBRAPA, 2010).

Apesar dos avanços da cultura da soja e dos grandes investimentos que têm sido feitos, há ainda a necessidade de diminuir os custos elevados relacionados à implantação de estratégias de controle para insetos-praga, nematóides, fungos fitopatogênicos e condições climáticas desfavoráveis (CONAB, 2008).

1.3 Limitações da Cultura da Soja no Brasil

Dentre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em culturas de soja estão as doenças. Cerca de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil e esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20%. Entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100%. No Brasil, o valor das perdas anuais por doenças é estimado em cerca de US\$ 2 bilhões (EMBRAPA, 2010).

1.3.1 Doenças Fúngicas

Plantas de soja apresentam quase todos os seus órgãos vegetativos afetados por doenças causadas por fungos (ROY; BAIRD; ABNEY, 2000). Segundo Rodrigues (2009), somente a parte aérea é agredida por, pelo menos, nove diferentes espécies de fungos, sendo algumas dessas causadoras de doenças em mais de um órgão (TABELA 01).

Somente as doenças foliares de final de ciclo causadas por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii* podem reduzir o rendimento em mais de 20%, o que equivale à perda anual de cerca de quatro milhões de toneladas de soja (EMBRAPA, 2010). Essas doenças ocorrem no estágio reprodutivo R5 (TABELA 02) e na mesma época. Devido às dificuldades para avaliá-las individualmente, são consideradas como o "complexo de doenças de final de ciclo". As perdas

TABELA 01 - Principais doenças fúngicas da parte aérea da soja e órgãos da planta agredidos

Fungos	Doenças	Parte agredida
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Ferrugem asiática	Folhas
<i>Microsphaera diffusa</i>	Oídeo	Folhas, haste e vagens
<i>Cercospora kikuchii</i>	Mancha púrpura	Folhas e sementes
<i>Cercospora sojina</i>	Mancha olho de rã	Folhas
<i>Septoria glycines</i>	Mancha parda	Folhas
<i>Corynespora cassicola</i>	Mancha alvo	Folhas
<i>Coletotrichum dematium</i>	Antracnose	Vagens, haste, folhas e sementes
<i>Phomopsis</i> sp.	Seca da haste e vagem	Vagens e haste
<i>Myrothecium roridum</i>	Mancha foliar de <i>Myrothecium</i>	Toda parte aérea

Fonte: EMBRAPA, 2010.

TABELA 02 – Estádios de desenvolvimento da soja

Estádio	Descrição
..... I. Fase Vegetativa	
VC	Da emergência a cotilédones
V1	Primeiro nó; folhas unifoliadas abertas.
V2	Segundo nó; primeiro trifólio aberto.
V3	Terceiro nó; segundo trifólio aberto.
V _n	Enésimo trifólio aberto, antes da floração.
..... II. Fase Reprodutiva (Observação na Haste Principal).....	
R5.1	Grãos perceptíveis ao tato a 10% da granação.
R5.2	Maioria das vagens com granação de 10%-25%.
R5.3	Maioria das vagens entre 25% e 50% de granação.
R5.4	Maioria das vagens entre 50% e 75% de granação.
R5.5	Maioria das vagens entre 75% e 100% de granação.
R6	Vagens com granação de 100% e folhas verdes.
R7.1	Início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens.
R7.2	Entre 51% e 75% de folhas e vagens amarelas.
R7.3	Mais de 76% de folhas e vagens amarelas.
R8.1	Início a 50% de desfolha.
R8.2	Mais de 50% de desfolhas à pré-colheita.
R9	Ponto de maturação de colheita.

Fonte: Fehr e Caviness, 1977

podem ser ainda maiores se associadas aos danos causados por outras doenças como cancro da haste, antracnose, nematóides de galha, nematóide de cisto e podridão branca da haste (RODRIGUES, 2009). Isoladamente, *C. kikuchii* pode provocar perda dos rendimentos de 45%, de acordo com o potencial produtivo da cultura, e isso é consequência da desfolha prematura da planta que leva a uma redução da granação na ordem de 30%. O fungo ainda causa nas sementes uma descoloração que ocasiona a uma desvalorização do lote, tanto para uso industrial como também para semeadura (RODRIGUES, 2009).

Outra doença responsável pelo descarte de um grande número de lotes de sementes é a chamada de seca da haste e da vagem causada pelo *Phomopsis sp* (TABELA 01). Seu maior dano é observado em anos quentes e chuvosos, nos estádios iniciais de formação das vagens R3 e R4 (TABELA 02) e na maturação, quando ocorre o retardamento de colheita por excesso de umidade (EMBRAPA, 2010).

As principais medidas de controle para doenças ocasionadas por fungos incluem a utilização de cultivares resistentes, um sistema integrado de manejo de culturas, semeadura de cultivares mais precoces, monitoramento constante, além da aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2010). No entanto, essas medidas possuem suas limitações. Por exemplo, para um grande número de doenças fúngicas não existem cultivares resistentes ou o número de cultivares é limitado. Ademais, os fungicidas apresentam toxicidade residual alta e aguda e, normalmente, longo período para serem degradados, sendo, portanto, perigosos tanto à saúde humana como ao meio ambiente (JANISICWICZ; KORSTEN, 2002; UNNIKISHNAN; NATH, 2002; TRIPATHI; DUBEY, 2004). Sendo assim, a busca de medidas alternativas para reduzir ou amenizar essas doenças, sem agredir o meio ambiente, é extremamente importante. Uma alternativa seria potencializar o próprio sistema de defesa da soja através da indução de proteínas de defesa, aumentando seus níveis nos estádios de desenvolvimento e nos sítios de infecção do patógeno, conferindo, assim, uma maior proteção e resistência contra as doenças.

1.4 Participação de Proteínas no Mecanismo de Defesa de Plantas contra Fungos

As plantas requerem uma ampla variedade de mecanismos de defesa para sobrepor eficazmente a invasão por patógenos microbianos, sendo esses mecanismos tanto constitutivos como induzidos (MENEZES; JARED, 2002; LIPKA; PANSTRUGA, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007; GHOSH, 2009). As respostas pré-formadas como tricomas, espinhos e calose são inespecíficas, protegendo a planta contra vários patógenos. Entretanto, a maioria das respostas é induzida após o reconhecimento do patógeno (FERREIRA *et al.*, 2007; GHOSH, 2009).

Elicitores produzidos e liberados pelo patógeno induzem resposta de defesa, compreendendo explosão oxidativa, morte celular programada, conhecida como resposta hipersensitiva (HR), acúmulo de fitoalexinas, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e reforço da parede celular (SLUSARENKO; FRASER; VAN LOON, 2001; TORRES; JONES; DANGL, 2005; FERNANDES *et al.*, 2006; BOCCARA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007).

PR-proteínas têm sido definidas como proteínas que são induzidas no hospedeiro em resposta ao ataque por patógenos ou em uma determinada situação (VAN LOON, 1994). Além de PR-proteínas, as plantas sintetizam outras proteínas e peptídeos antifúngicos que têm atraído a atenção de um grande número de pesquisadores, devido ao seu potencial em proteger grãos economicamente importantes contra o ataque desses patógenos (NG, 2004; WANG; NG, 2006a; LAM; NG, 2009). Muitos desses compostos também inibem o crescimento de fungos patogênicos ao homem (SELITRENNIKOFF, 2001; PELEGRINI *et al.*, 2009; PARK; LEE, 2009). Vários tipos de novos peptídeos e proteínas exibindo essa atividade têm sido descobertos (AGIZZIO *et al.*, 2006; YE; NG, 2009). Alguns exemplos desses compostos incluem: proteínas semelhantes à taumatina (HO *et al.*, 2007); inibidores de proteases (WANG; NG, 2006b); quitinases (TAIRA *et al.*, 2005); glucanases (VOGELSANG; BARZ, 1993); proteínas tipo ciclofilinas (YE; NG, 2000); proteínas inativadoras de ribossomos (LEAB *et al.*, 1991; NG; PARKASH, 2002); lectinas (MELO *et al.*, 2005; XIA; NG, 2005; NGAI; NG, 2007); peptídeos antimicrobianos (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002; EGOROV *et al.*, 2005), proteínas de reserva do tipo albumina 2S (PELEGRINI *et al.*, 2006); ciclotídeos (GRAN; SLETTEN; SKJELDAL, 2008) e toxinas (VASCONCELOS *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2010).

1.4.1 Mecanismo de Ação de Proteínas Antifúngicas

Essencialmente, uma proteína é dita fungicida, quando é capaz de matar o esporo ou fugistática, quando inibe a germinação do mesmo ou o crescimento vegetativo do fungo (NG, 2004; MENEGASSI *et al.*, 2008).

De uma forma mais abrangente, dependo de seu modo de ação, proteínas antifúngicas podem ser agrupadas em: 1) as que atuam na parede celular do patógeno; 2) as que modificam as propriedades da sua membrana celular e 3) as que utilizam a maquinaria intracelular fúngica para impedir o desenvolvimento desses organismos (FERREIRA *et al.*, 2007). Na Tabela 03, estão apresentados exemplos de mecanismos de ação dessas proteínas.

1.4.1.1 Proteínas Antifúngicas que Atuam na Parede Celular

A parede celular dos fungos, essencialmente composta de polissacarídeos e proteínas, constitui uma proteção do organismo contra condições hostis, além de alguns de seus componentes funcionarem como elicitores, gerando sinais de invasão e infecção para a planta (SELITRENNIKOFF, 2001; FERREIRA *et al.*, 2007). É importante ressaltar que os fungos possuem uma pressão de turgor significativa e que qualquer alteração na parede celular resulta em lise celular (HAROLD; CALDWELL, 1990; KAMINSKYJ; GARRILL; HEATH, 1992).

Quitina e β -1,3-glucanos são sintetizados simultaneamente no ápice de hifas de fungos filamentosos (THEIS; STAHL, 2004). Portanto, não é surpreendente o número de estudos que relatam uma ação sinérgica entre quitinases e β -1,3-glucanases na hidrólise de fibras mistas glucana-quitina, tanto *in vitro* e *in vivo* (STINTZI *et al.*, 1993; JACH *et al.*, 1995). De fato, Ji e Kúc (1996) demonstraram um efeito sinérgico entre uma isoforma de quitinase e uma β -1,3-glucanase, ambas isoladas de folhas de *Cucumis sativus*, que quando combinadas inibiram o crescimento do fungo *Colletotrichum lagenarium* em uma concentração muito menor do que aquela observada para as proteínas individualmente. A combinação da concentração mínima inibitória consistiu de 4 e 10 μ g de β -1,3-glucanase e de quitinase, respectivamente. Tem sido proposto que β -1,3-glucanase e quitinase afetam o crescimento de fungos através de lise da parede celular das hifas (MAUCH *et al.*, 1988) ou por

TABELA 03 – Classes de proteínas antifúngicas e mecanismo de ação

Classe	Ocorrência	Principais características	Mecanismo de ação
PR-1 proteínas	Plantas	Massa molecular de 15 a 17 kDa. Homologia com proteínas ricas em cisteínas	Desconhecido
β - Glucanase	Microorganismos, plantas, invertebrados e vertebrados	Atividade β -1,3- endonuglucanase	Hidrólise de β -1,3- glucanos presente na parede celular
Quitinases	Vírus, bactérias, fungos, peixes, insetos, mamíferos e anfíbios	Atividade quitinásica e massas moleculares de 26-43 kDa	Clivagem de polímeros de quitina presente na parede celular
Proteínas ligantes a quitina	Bactérias, plantas, insetos e crustáceos	Massas moleculares de 3,1 a 20 kDa	Ligação a quitina
Osmotinas e Proteínas semelhantes à taumatina	Plantas	Massas moleculares acima de 22 kDa e homologia a taumatina	Formação de poros na membrana
Defensinas/tioninas	Mamíferos, insetos, fungos e plantas	Baixa massa molecular, proteínas ricas em cisteína	Influxo de íons
Proteínas semelhantes à ciclofilinas	Bactérias, plantas animais e fungos	Exemplo: mungina	Desconhecido
Proteínas Inativadoras de ribossomos	Fungos e plantas	N-glicosidases que depurinam o rRNA	Inativação de ribossomos
Proteínas transferidoras de Lipídeos (LTPs)	Mamíferos, plantas, fungos e bactérias	Massa molecular aparente de 8,7 kDa	Desconhecido
Inibidores de proteases	Plantas, animais e microorganismos	Inibidores de proteases serínicas e cisteínicas	Desconhecido

Adaptado de FERREIRA et al., 2007.

interferir com o equilíbrio entre a síntese e hidrólise da parede celular durante a extensão da mesma (BARTNICKI-GARCIA, 1973).

Gifoni (2009) purificou de sementes de *Moringa oleifera* uma proteína ligante à quitina, denominada de *Mo-CBP₃*, ativa contra o fungo *Fusarium solani*. A uma concentração de 100 µg/mL, *Mo-CBP₃* foi fungicida para os esporos desse fungo, uma vez que, retirados da presença da proteína e de volta às condições favoráveis à sua germinação, os esporos não mais foram capazes de se desenvolver. A atividade antifúngica de proteínas ligantes à quitina é devida, principalmente, à sua habilidade de se ligar a esse polímero presente na parede celular fúngica, resultando na disrupção da polaridade celular e, como consequência, inibição do crescimento (BORMANN *et al.*, 1999).

Vicilinas de sementes de *Vigna unguiculata* e de outras sementes de leguminosas também interferem com a germinação de esporos ou conídios de fungos fitopatogênicos, possivelmente por se ligarem à quitina presente na parede celular (GOMES *et al.*, 1997). Por exemplo, a vicilina de *V. unguiculata* afeta o crescimento e inibe a germinação dos esporos de *F. solani*, *F. oxysporum*, *Collectotricum musae*, *Phytophthora caprici*, *Neurospora crassa* e *Ustilago maydisporidia* e liga-se à quitina de *Saccharomyces cerevisiae* levando a um desenvolvimento anormal dessas células (GOMES *et al.*, 1998a,b).

1.4.1.2 Proteínas Antifúngicas que Atuam na Membrana Celular

A membrana plasmática é o alvo para a maioria das proteínas e peptídeos antifúngicos (THEIS; STAHL, 2004). Mais de 500 proteínas têm sido descritas e acredita-se que elas interagem com a membrana de fungos, levando à formação de poros, efluxo de componentes celulares e mudanças no potencial de membrana (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000).

Proteínas e peptídeos que atuam na membrana exibem uma enorme diversidade de estruturas, mas partilham pelo menos duas características comuns: uma carga positiva líquida sob condições fisiológicas, que promove a interação com carga negativa das superfícies microbianas e uma estrutura anfipática, que permite a incorporação na membrana do patógeno (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000).

Uma nova defensina isolada de sementes de *Lens culinaris* inibiu o crescimento do fungo *Aspergillus niger* na concentração de 28,7 μM (FINKINA *et al.*, 2008). O modo de ação de defensinas de plantas ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, é sabido que esses peptídeos induzem um rápido efluxo de potássio, absorção de cálcio, alcalinização do meio e mudanças nos potenciais da membrana de *Neurospora crassa* (THEIS; STAHL, 2004). Em contraste com outros modos de ação de proteínas de membrana, defensinas não formam poros em membranas artificiais (THEVISSSEN *et al.*, 1996).

Park e colaboradores (2010) isolaram de *Cucurbita pepo* uma nova proteína de 40 kDa, denominada de PR-1, que inibiu o crescimento de *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *Rhizoctonia solani*, bem como da levedura *Candida albicans* nas concentrações de 10 a 20 μM . Pr-1 promoveu o influxo de SYTOX Green, um corante nuclear que somente entra na célula por danos na membrana, em células de *C. albicans* e *F. solani*, sugerindo que Pr-1 causa permeabilização de membrana e pode inibir o crescimento dos fungos através de efluxo de componentes intracelulares.

Lectinas constituem, também, outra classe de proteínas que podem apresentar atividade antifúngica, cujo mecanismo de ação pode estar relacionado a alterações na membrana celular. Uma lectina isolada de sementes de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz de interferir no transporte de prótons na membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, inibindo 60% da atividade da bomba de próton H^+ -ATPase (MELO *et al.*, 2005). Bombas de prótons presentes na membrana celular são responsáveis pela regulação e manutenção do gradiente de prótons, necessário para a entrada de nutrientes (SERRANO, 1989; MONK; PERLIN, 1994).

1.4.1.3 Proteínas Antifúngicas que Atuam em Alvos Intracelulares

Adicionalmente às classes de proteínas já mencionadas, que atuam na superfície celular dos fungos, outras classes de peptídeos/proteínas antifúngicos inibem o crescimento desses organismos por impedirem a síntese ou a atividade de componentes vitais, tais como proteínas, RNA e DNA.

Bertini e colaboradores (2009) demonstraram que uma PR-4 de trigo foi capaz de inibir o crescimento do fungo *F. culmorum* na concentração de 75

µg/mL. Os autores concluíram que a atividade antifúngica dessa proteína estava associada à sua atividade ribonucleásica.

Hispingina, uma proteína inativadora de ribossomos do tipo I, foi isolada e caracterizada a partir de sementes de *Benincasa hispida*. Interessantemente, a hispingina mostrou atividade antifúngica espécie-específica, uma vez que os fungos *Coprinus comatus*, *F. oxysporum*, *Physalospora pisicola* e *Mycosphaella arachidicola* foram sensíveis à proteína, ao passo que *Botrytis cinerea* mostrou-se resistente (NG; PARKASH, 2002). Proteínas inativadoras de ribossomos possuem atividade antifúngica intrínseca devido à sua habilidade de inativar ribossomos de fungos tanto *in vitro* como *in situ* (SELITRENNIKOFF, 2001).

Uma deoxiribonuclease de 30 kDa foi isolada de sementes de *Asparagus officinalis* e exerceu atividade contra *B. cinerea*. A maioria das plantas desenvolveu mecanismos, incluindo DNAses, para impedir outros organismos de usarem informações gênicas das células vegetais em benefício próprio (DE LAFONTEYNE; SORMANN; VAN DE COTTE, 1990).

1.5 Potencial Biotecnológico de Proteínas Vegetais contra Fungos

No décimo terceiro ano desde a introdução da biotecnologia agrícola no Brasil, os benefícios econômicos capturados pelos produtores rurais usuários desta tecnologia e pela indústria detentora da tecnologia acumulam o montante de US\$ 3,6 bilhões. Do benefício econômico gerado, a soja, por ser a cultura que adota a biotecnologia há mais tempo, é responsável pela maior fatia deste benefício, 78% do total (CÉLEBRES, 2010).

A utilização de proteínas antifúngicas como estratégia biotecnológica no controle de fungos fitopatogênicos é baseada em trabalhos experimentais preliminares, que identificaram e analisaram sua atividade *in vitro* contra diferentes patógenos.

Os genes que codificam alguns desses peptídeos e proteínas antifúngicos têm sido utilizados para produzir plantas geneticamente modificadas, no intuito de aumentar a resistência contra doenças fúngicas (HOLTORF *et al.*, 1998; TURRINI *et al.*, 2004). Por exemplo, um peptídeo antifúngico ligante à quitina isolado de *Pharbitis nil* e denominado de Pn-AMP2 mostrou atividade *in vitro* contra os fungos *F. oxysporum* e *Phytophthora capsici*. Quando o cDNA desse peptídeo foi

expresso constitutivamente em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), estas passaram a apresentar maior resistência a esses fungos (LEE *et al.*, 2003). Outro exemplo de peptídeo utilizado para aumentar a resistência em plantas contra fungos é uma defensina de sementes de *Mirabilis jalapa*, que possui atividade antifúngica *in vitro* contra vários fungos fitopatogênicos incluindo *Magnaporthe oryzae* (PRASAD; JHA; CHATTOO, 2008.). Os autores demonstraram que o arroz (*Oryza sativa* L.) transgênico expressando o gene para a defensina mostrou aumento na resistência a *M. grisea*, o agente causal da doença brusone do arroz.

Uma alternativa que pode ser usada na biotecnologia para aumentar a proteção de plantas contra fungos sem, contudo, recorrer ao uso de transgenia é induzir resistência sistêmica através da aplicação de elicitores, como ácido jasmônico, ácido salicílico ou até mesmo produtos da planta, como extratos protéicos. Por exemplo, Devaiah, Mahadevappa e Shetty (2009) demonstraram que a aplicação de extratos protéicos de folhas de *Datura metel* protegeu plantas de milho contra a doença causada pelo míldio *Sclerospora graminicola*. A proteção oferecida pelo extrato de *D. metel* foi através de resistência sistêmica adquirida (SAR) e foi ativa em todas as fases do crescimento das plantas.

Muito embora haja uma corrida científica na busca de proteínas antifúngicas com potencial para o biocontrole de fungos fitopatogênicos, muitas dessas proteínas permanecem com o seu mecanismo de ação ainda desconhecido (YE; NG, 2009).

1.6 Ferramentas Biológicas e Moleculares para Estudo de Mecanismos de Ação Antifúngico

No intuito de explorar plenamente o uso potencial de peptídeos e proteínas como armas químicas contra fungos, é essencial compreender bem o mecanismo de ação pelo qual elas atuam para evitar danos tanto ao homem quanto ao meio ambiente. Sendo assim, pesquisadores utilizam ferramentas biológicas, bioquímicas e moleculares para melhor compreender o modo de atuação dessas proteínas.

1.6.1 Leveduras

Há várias características inerentes às leveduras que as fazem um bom modelo de organismo eucarioto para diferentes abordagens. Algumas dessas propriedades correspondem: (1) são microorganismos unicelulares, de baixo custo e fácil cultivo, permitindo a realização de experimentos controlados em condições variadas; (2) fácil manipulação genética; (3) possibilidade de expressar genes heterólogos; (4) disponibilidade de uma coleção de mutantes de deleção única para células diplóides e genes não-essenciais também para células haplóides; (5) existência de infra-estrutura de pesquisa disponível, como Saccharomyces Genome Database (SGD) (www.yeastgenome.org) e Candida Genome Database (CGD) (www.candidagenome.org), além de um grande número de tecnologias para análise de alto rendimento (levedura tem sido usada para estudos pioneiros de transcriptoma, proteoma e interatoma) e (6) ocorrência de homologia entre grande parte dos genes de leveduras com genes de humanos (NIELSEN, 2009).

O uso experimental de células de levedura, principalmente no que se refere ao emprego de métodos de genética molecular, resultou em sua ampla aplicação como modelo em estudos de esclarecimento da regulação do ciclo celular, biogênese de organelas, vias de sinalização celular e muitas outras funções, incluindo mecanismos de transporte (KLIPP *et al.*, 2005). Além disso, células de levedura vêm sendo utilizadas também no estudo de mecanismo de ação de proteínas e peptídeos antifúngicos. Nesse sentido, Park e colaboradores (2010) utilizaram células de *C. albicans* e abordagens bioquímicas, tendo sugerido que uma PR-1, de 40 kDa, é uma proteína antifúngica que exerce seu efeito causando permeabilidade na membrana. Utilizando também leveduras como modelo, Ribeiro e colaboradores (2007) verificaram que um peptídeo isolado de sementes de pimenta é um antifúngico que pode estar atuando na membrana inibindo a bomba de próton H⁺-ATPase.

1.6.2 Microarranjos de DNA – Uma Ferramenta poderosa na Análise da Expressão Gênica

As lâminas de microarranjos contendo seqüências nucleotídicas são utilizadas para duas finalidades principais: em estudos de genômica comparativa e na análise da expressão diferencial de genes. Neste caso, representa uma ferramenta muito poderosa para a descoberta de genes envolvidos em diversos processos biológicos, uma vez que é possível fazer uma varredura da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, ou seja, uma avaliação da expressão gênica em larga escala (REYMOND *et al.*, 2000; STOUGHTON, 2005; KERSCHGENS; EGENER-KUHN; MERMOD, 2009). A grande quantidade de dados que é obtida com a tecnologia de microarranjos de DNA proporciona idéias para entender processos moleculares ou vias complexas envolvidas no funcionamento das células em determinada condição (BOOTHROYD *et al.*, 2003).

Os microarranjos de DNA ou *chips* de DNA consistem em uma coleção de seqüências nucleotídicas fixadas a uma lâmina de vidro, resina ou plástico, com pontos microscópicos em uma ordem específica. As seqüências imobilizadas na lâmina podem ser de DNA genômico, cDNA, ou de oligonucleotídeos que representam a janela de leitura dos genes. Na tecnologia desenvolvida pela Affmetrix[®], pequenos oligonucleotídeos podem ser sintetizados *in situ* diretamente sobre a lâmina (LOCKHART *et al.*, 1996).

A descoberta dos genes se baseia na hibridização de sondas marcadas com fluoróforos, provenientes de amostras biológicas de diferentes tecidos, cepas, estágios de desenvolvimento ou condições ambiente/fisiológicas (STEARNS *et al.*, 2003). A abundância das sondas é determinada a partir da hibridização diferencial com as seqüências fixadas na lâmina (FIGURA 03).

Para gerar a informação sobre a expressão diferencial, as amostras podem ser marcadas com um ou dois fluoróforos. No primeiro caso, as amostras são marcadas e hibridizadas em lâminas diferentes e depois as imagens são sobrepostas, comparadas e analisadas. No segundo caso, duas amostras são marcadas com fluoróforos diferentes, usualmente Cianina3 (Cy3) e Cianina5 (Cy5), e hibridizadas simultaneamente na mesma lâmina que depois é varrida com laser para gerar imagens a partir dos dois canais para posterior análise dos dados (STEARNS *et al.*, 2003).

A tecnologia dos microarranjos também está sendo aplicada na área de proteômica. Atualmente, existem disponíveis lâminas com proteínas imobilizadas, que permitem o estudo de interações proteína-proteína, proteína-droga e

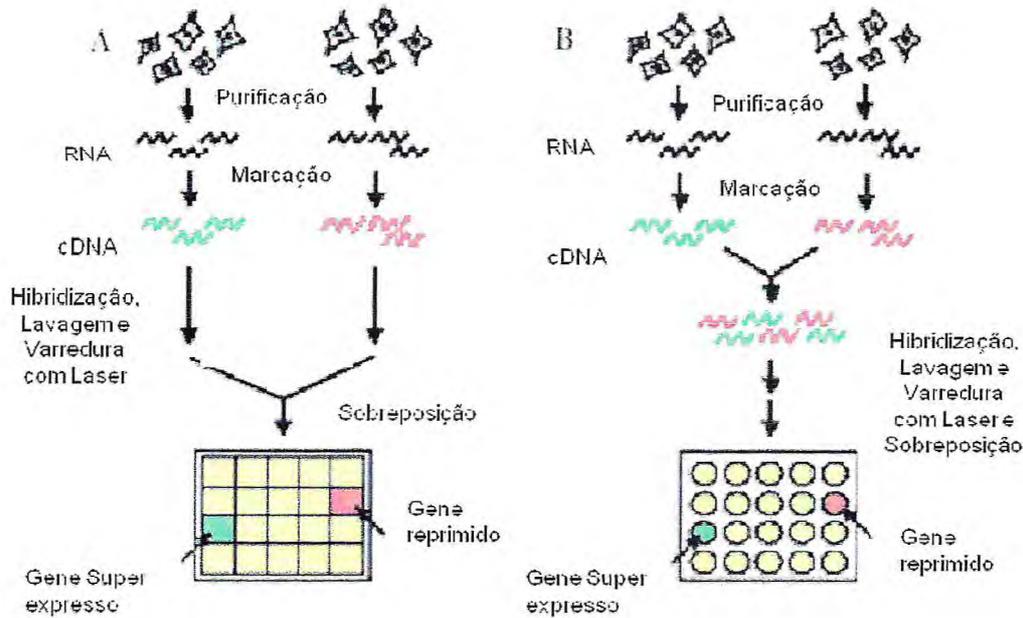


FIGURA 03 - Análise de expressão diferencial de genes por microarranjos de DNA. A - análise de um único fluoróforo e duas lâminas para gerar os perfis de expressão de duas ou mais amostras. B – análise usando dois fluoróforos e uma única lâmina para gerar perfis de expressão de duas amostras diferentes. Fonte: adaptada de Stears, 2003.

modificações pós-traducionais, entre outros (STEARNS *et al.*, 2003; HALL; PTACEK; SNYDER, 2007; KERSCHGENS; EGENER-KUHN.; MERMOD, 2009).

O uso de microarranjos de DNA está se tornando mais difundido e melhor padronizado, uma vez que os custos e complexidades estão sendo reduzidos (GARAIZAR *et al.*, 2006). Lis e colaboradores (2010) utilizaram essa metodologia para avaliar o mecanismo de ação de um peptídeo derivado da mucina denominado MUC7 utilizando *C. albicans* como modelo. Eles verificaram vários genes diferencialmente expressos e envolvidos no estresse celular, na manutenção da parede celular e no transporte de pequenas moléculas. Ademais, eles sugeriram que o mecanismo de ação de MUC7 estaria relacionado com a via de sinalização cálcio/calcineurina. Utilizando também microarranjos de DNA e *C. albicans*, Vylkova e colaboradores (2007) determinaram que a ação antifúngica da Histatina 5 envolve estresse osmótico via ativação de MAP quinase.

Poucos são os relatos na literatura destacando a análise da expressão gênica das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* após tratamento com uma proteína antifúngica de origem vegetal.

1.6.3 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Após um experimento de microarranjos de DNA é extremamente importante validar alguns genes diferencialmente expressos por outras técnicas. O método mais utilizado hoje com esse propósito é a amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) devido à rapidez, especificidade e sensibilidade que essa técnica detecta e quantifica ácidos nucleicos (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). RT-qPCR permite coletar dados da PCR com amplificação e detecção em tempo real, através da captação de fluorescência proporcionalmente à quantidade de produtos amplificados (HIGUCHI *et al.*, 1993). A quantificação por RT-qPCR necessita de uma série de padronizações, ou seja, normalização de vários parâmetros como quantidade inicial da amostra, integridade e quantidade de RNA, eficiência enzimática e da amplificação da PCR e, principalmente, o uso de genes de referência (*housekeepings*) adequados (BUSTIN, 2002; GINZINGER, 2002).

Os genes de referência comumente utilizados são principalmente os codificadores de proteínas responsáveis pela manutenção de estruturas e

metabolismo básico da célula, como por exemplo, tubulinas (SERELS *et al.*, 1998), actinas (WEI *et al.*, 1997) e 18S, 28S rRNA (BHATIA *et al.*, 1994).

Os três eventos que ocorrem na PCR convencional, também acontecem na PCR em tempo real. Resumidamente, o primeiro é a desnaturação da fita dupla de DNA que acontece quando a mistura de reação é aquecida a 92-96 °C. O segundo evento do ciclo é o anelamento dos iniciadores à fita de DNA que será sintetizada. A temperatura varia de 37 a 65 °C, dependendo da homologia entre os iniciadores pela seqüência alvo e da composição dos iniciadores. A última etapa do ciclo é a extensão, a partir dos iniciadores, por uma polimerase termoestável. Tradicionalmente, essa parte do ciclo é realizada a 72 °C. O tempo necessário para copiar a fita de DNA complementar depende do tamanho do produto de PCR (DIEFFENBACH; DVEKSLER, 1995). O diferencial é que além dos componentes tradicionais utilizados na PCR convencional como tampão Tris-HCl, MgCl₂, dNTP, iniciadores e *Taq* DNA polimerase, a PCR em tempo real necessita de um sistema de monitoramento que é composto por corantes fluorescentes, os quais se ligam ao produto formado e reportam sua presença a partir da emissão de fluorescência e de um termociclador que seja adaptado para gravar os resultados a cada novo ciclo da reação. Ou seja, o sistema de PCR em tempo real utiliza, exclusivamente, fluorescência como método de detecção. Atualmente, os fluoróforos mais populares são o SYBR Green 1 e o BOXTO (ZIPPER *et al.*, 2004). Esses corantes não apresentam fluorescência quando estão livres em solução, mas tornam-se fluorescentes quando se ligam ao DNA, presumivelmente na fenda menor da hélice de DNA. Na PCR, a fluorescência desses corantes aumenta proporcionalmente à quantidade de produto duplamente formado.

1.7 Toxinas Protéicas de Sementes de Soja e Sua Atuação na Defesa Vegetal

Segundo Oliveira (2009), uma proteína é considerada tóxica, quando é capaz de interferir negativamente em algum parâmetro biológico de organismos que tenham entrado em contato com determinadas quantidades dessa molécula, através de vias específicas (endovenosa, intraperitoneal, oral). Assim, pode ser dito que a toxicidade de uma dada substância depende de vários fatores, como: organismo teste; via utilizada e dose ou quantidade de proteína utilizada.

Os estudos de toxicidade em soja começaram com Liener (1951), quando verificou que o extrato bruto aquoso de sementes era capaz de matar camundongos, quando injetado por via intraperitoneal (i.p.). Apesar da descoberta de toxicidade aguda nesses extratos e, ainda, da observação de que o princípio tóxico era de natureza protéica, o isolamento e caracterização da(s) toxina(s) não se sucederam de imediato, fato este justificado pela instabilidade e baixo rendimento da(s) proteína(s) durante as etapas de purificação (SAMBETH; NESHEIM; SERAFIN, 1967). Somente quase 40 anos depois, é que os estudos foram retomados, quando Carlini e colaboradores (1988) verificaram a coexistência de lectinas e toxinas em várias sementes de leguminosas, inclusive na soja.

Em 1994, Vasconcelos e colaboradores isolaram e caracterizaram parcialmente uma proteína tóxica da soja, denominada de soyatoxina (SYTX), incapaz de inibir a tripsina e de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies. Neste mesmo trabalho, durante o processo de purificação da SYTX, foi verificada a existência de outra fração tóxica, servindo, alguns anos mais tarde, como fonte para o isolamento e caracterização parcial de outra toxina, denominada de toxina da soja (SBTX), com características físico-químicas distintas da SYTX, lectina e inibidores de tripsina da soja (SIEBRA, 2004).

Além de SYTX e SBTX, sementes de soja possuem ainda outra toxina isolada e caracterizada por Oliveira (2009) e denominada de *Gm-TX*. A tabela 03 mostra as principais características das três toxinas. Essa proteína apresenta similaridades estruturais com SBTX, além de ser exsudada por sementes de soja e apresenta potente atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*. O conjunto de resultados obtidos sugere que *Gm-TX*, assim como as outras toxinas da soja, é uma proteína relacionada à defesa vegetal.

Além das toxinas citadas, é possível que a soja contenha outras proteínas tóxicas. De fato, tem sido relatado que, embora mais de cem proteínas tenham sido identificadas em sementes de soja (HERMAN *et al.*, 2003), muitas delas ainda estão para ser identificadas e caracterizadas (MOONEY; KRISHNAN; THELEN, 2004; HADJDUCH *et al.*, 2005).

1.7.1 Toxina da Soja (SBTX)

TABELA 04 – Comparação das propriedades bioquímicas e biológicas de *Glycine max* toxina (GmTX)^a, Soyatoxina (SYTX)^b e toxina da soja (SBTX)^b

	Gm-TX	SYTX	SBTX
Mr (SDS-PAGE)			
Nativa	28 kDa	21 kDa	44 kDa
Subunidades	Não	Não	27:17 kDa
pI	5,1-5,2	4,4-4,6	8,2
Seqüência NH ₂ -terminal	KTISSDSPFFNCREK	Bloqueado	ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD (44 e 27 kDa) PNPKVFFDMTIGGQSAGRIVMEEYA (17 kDa)
Carboidrato	<0,5%	<0,05%	5%
Coefficiente de Extinção	16,9	Não determinado	6,3
Estabilidade	0,005M DTT/4 °C	0,005M DTT/4 °C	0,005M DTT/4 °C
DL ₅₀ (mg/kg de peso corpóreo)	4,5	7-8	6,3
Atividade inibitória de tripsina	Não	Não	Não
Atividade hemaglutinante	Sim (mediada por IgG)	Não	Não
Atividade urease	Não	Não	Não
Atividade quitinase	Não	Não	Não
Atividade Ribonuclease	1821,42 UA/h/mgP	Não testada	Não Testada
Atividade inseticida	Sim	Sim	Sim
Atividade antifúngica	Não	Não testada	Sim

a- Dados de Oliveira, 2009; b- Dados de Vasconcelos *et al.*, 1994 e Vasconcelos *et al.*, 2008.

A SBTX é uma proteína de 44 kDa, composta por duas subunidades distintas, unidas por ponte dissulfeto. Esta toxina apresenta uma DL₅₀ de 6,0 e 5,6 mg/kg de peso corpóreo, quando administrada em camundongos pelas vias intra-peritoneal e intravenosa. Entretanto, SBTX não apresentou toxicidade para mamíferos quando administrada pela via oral. Essa toxina foi ainda capaz de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* e de exercer efeitos tóxicos aos insetos *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*. Estudos adicionais mostraram que essa toxina não está apenas localizada nas sementes, tendo sido detectada também no caule, folha e raiz (SIEBRA, 2004).

Estudos posteriores realizados por Moraes (2007) demonstraram que SBTX possui uma alta similaridade na sua seqüência primária com as de outras proteínas reconhecidas com função de defesa, além disso, foi verificada sua atividade inibitória para fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger* e *Penicillium hergueli*, bem como sua indução em sementes de soja tratadas com ácido jasmônico.

A partir da clonagem do cDNA da SBTX por Oliveira (2009), estudos mostraram que essa proteína está expressa principalmente nos cotilédones de sementes de soja, mas transcritos para essa proteína foram identificados em toda a parte da planta, particularmente em resposta à infecção com fungos fitopatogênicos e estresses abióticos.

Como os resultados de avaliação de atividades biológicas e de bioinformática da SBTX, obtidos anteriormente, sugerem sua participação nos mecanismos de defesa da soja contra fungos, o presente trabalho foi conduzido com a premissa de fornecer novos dados sobre o mecanismo de ação dessa toxina frente a esses organismos, bem como avaliar sua expressão em órgãos de plantas jovens e adultas que são locais de infecção dos patógenos.

2. HIPÓTESES

Para o aproveitamento biotecnológico de SBTX como uma proteína ativa contra fungos fitopatogênicos que causam grandes perdas econômicas tanto para a cultura da soja como de outras culturas importantes para o país, o nosso entendimento é que o conhecimento do espectro e mecanismo de ação da SBTX é uma etapa imprescindível, para que a toxina possa se constituir em uma excelente ferramenta aplicável em várias áreas de pesquisa, inclusive como uma molécula que poderá ser aproveitada para o melhoramento de culturas de interesse, através da engenharia genética, ou que quando aplicada diretamente nas plantas possa induzir respostas de defesa ou tolerância aos estresses ambientais, tudo isso trazendo benefícios sociais, econômicos e ecológicos de amplo alcance. Considerando as premissas descritas acima, esta tese foi proposta com o objetivo de testar as seguintes hipóteses:

1- SBTX é ativa contra os fungos patogênicos à soja e está presente em partes vegetais que são locais de infecção, podendo constituir uma ferramenta biotecnológica para o controle desses patógenos.

2- SBTX é um antifúngico que atua na parede e/ou membrana, ou ainda é capaz de causar alteração no padrão de expressão gênica do patógeno.

CAPÍTULO 2

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA TOXINA DA SOJA (SBTX) CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

A agricultura deve tornar-se mais produtiva a fim de alimentar uma população mundial que excedeu 6 bilhões de habitantes em 2000 e cujas projeções para 2025 e 2050 são de, aproximadamente, 7,8 e 9 bilhões, respectivamente (FAO, 2009). Além da crescente escassez de recursos, a agricultura mundial terá de lidar com os efeitos das alterações climáticas que reduzirão a disponibilidade de água e levarão a um aumento de pragas vegetais e doenças. O potencial de produção agrícola até 2080-2100 pode ser reduzido em até 30% na África e até 21% nos países em desenvolvimento como um todo (FAO, 2009).

Uma das estratégias para alcançar esse aumento na produção de alimentos está diretamente relacionada, pelo menos em parte, ao controle mais eficiente nas perdas provenientes de agentes bióticos (herbívoros, fitopatógenos e ervas daninhas) (AGRIOS, 1997; FAO, 2009). Por exemplo, somente as doenças foliares de final de ciclo que ocorrem na soja, causadas pelos fungos *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*, podem reduzir o rendimento em mais de 20%, o que equivale à uma perda anual de cerca de quatro milhões de toneladas de soja (EMBRAPA, 2010). Os métodos de controle atualmente empregados dependem, basicamente, do uso de defensivos agrícolas dentro de um manejo integrado de pragas. Entretanto, há uma demanda crescente por uma agricultura limpa, com menor uso de energia e produtos químicos, a fim de evitar a presença de resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos, além de reduzir as contaminações aos agricultores. Sendo assim, a proteção das plantas através da indução de resistência vem se tornando um método alternativo que pode ser utilizado pela agricultura para aumentar as respostas de defesa da planta contra patógenos sem, contudo recorrer ao uso desses defensivos (JANISICWICZ; KORSTEN, 2002; UNNIKISHNAN; NATH, 2002; TRIPATHI; DUBEY, 2004, PICKETT *et. al.*, 2007).

Em consonância com o que foi exposto, é que uma proteína tóxica (44 kDa) isolada de sementes de soja, conhecida como toxina da soja (SBTX), foi selecionada neste trabalho. SBTX possui um potencial de aproveitamento biotecnológico como uma proteína antifúngica passível de indução, uma vez que essa proteína é capaz de inibir o crescimento do fungo *Cercospora sojina* Hara

causador da doença foliar chamada mancha do olho-de-rã), bem como dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium herquei* (relacionados a doenças de armazenamento das sementes de soja). A SBTX, ainda, possui seu cDNA isolado e sequenciado para uma de suas subunidades, cuja análise através de pesquisa de *Expressed Sequence Tags* (EST) nos bancos de dados revela sua expressão em sementes, assim como a presença de transcritos para essa proteína em toda a parte da planta, particularmente em resposta à infecção com fungos fitopatogênicos e a estresses abióticos (SIEBRA, 2004; MORAIS, 2007; OLIVEIRA, 2009). Ademais, essa proteína não apresenta toxicidade oral para mamíferos, é capaz de interferir no desenvolvimento biológico dos insetos-praga *Callosobruchus maculatus* e *Dysdercus peruvianus*, está presente em raiz, caule e folhas de plantas estioladas e foi induzida em sementes de soja tratadas com ácido jasmônico (SIEBRA, 2004; MORAIS, 2007). O conjunto de dados reforça a idéia da participação dessa toxina como uma proteína de defesa, podendo ser utilizada no controle de fitopatógenos.

Sendo assim, as atividades propostas nesse capítulo têm como eixo os seguintes questionamentos:

1. *Qual seria o espectro de ação dessa proteína, visando à aplicação biotecnológica de SBTX como proteína antifúngica?*
2. *Em que etapa do desenvolvimento do fungo a SBTX estaria atuando?*
3. *Seria SBTX expressa em folhas de soja que são sítios de infecção dos patógenos?*
4. *Teria SBTX seus níveis de expressão aumentados em folhas adultas de soja injuriadas mecanicamente?*

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o potencial biotecnológico da SBTX como uma ferramenta para o controle de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica.

2.2 Específicos

- Verificar a ação da SBTX sobre a germinação e crescimento de hifas de fungos filamentosos que atacam a soja como *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phomopsis sp*;
- Verificar os níveis de expressão da SBTX em folhas de plantas jovens e adultas de soja.

3. MATERIAIS

3.1 Sementes de soja

Para a produção de farinha e purificação da toxina, sementes de soja cultivar IAC-24 foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brasil, e armazenadas até o uso em frascos fechados e livres de infecções causadas por fungos ou ataques de insetos. Para plantio em casa de vegetação, sementes de soja não tratadas com fungicidas (cultivar BRS Pala) foram fornecidas pela Embrapa - Fundação Pró-sementes (Passo Fundo - RS). Essas sementes foram selecionadas devido a um maior poder germinativo que elas possuem quando comparadas com sementes do genótipo IAC-24. Vale ressaltar que o cultivar BRS Pala apresenta toxicidade semelhante a IAC-24. Todas as sementes utilizadas eram livres de danos mecânicos e sem alterações morfológicas perceptíveis.

3.2 Fungos fitopatogênicos

Cercospora kikuchii, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phomopsis sp* foram obtidos da micoteca mantida no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). Os fungos *C. gloeosporioides* e *Phomopsis sp* foram mantidos em meios de cultura ágar Sabouraud, já o fungo *Cercospora kikuchii* foi mantido em meio ágar tomate. Todos os meios foram mantidos em condições estéreis e adequadas ao crescimento e desenvolvimento dos microorganismos.

3.3 Animais experimentais

Para detecção da atividade tóxica de SBTX foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos Swiss, machos ou fêmeas, com massa corporal entre 20 e 30 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - Campus do Pici e aclimatados em caixas plásticas contendo água e ração comercial *ad libitum* sendo submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas.

A produção de anticorpos policlonais anti-SBTX, a serem usados nos ensaios de imunodeteção, foi realizada em coelhos albinos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), adquiridos do coelhário do Departamento de Zootecnia (UFC) com 8 a 12 semanas de idade, mantidos em gaiolas apropriadas e em temperatura não superior a 25 °C. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

3.4 Reagentes e soluções

Reagentes utilizados para purificação e ensaios imunológicos (ELISA) como: Tris (Ultra Pure TrisTM), inibidores de protease (PMSF e pepstatina A), acrilamida, N,N' - metileno bisacrilamida, IgG de cabra conjugada com fosfatase alcalina produzida contra IgG de coelho, "Coomassie Brilliant Blue" (G e R) 250, nitrato de prata, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio e marcadores de massa molecular (*Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder*) foram obtidos de empresas como Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA ou Invitrogen, EUA. As matrizes cromatográficas de DEAE-Celulose e CM-Sepharose foram obtidas da GE HeathCare, Uppsala, Suécia. Demais reagentes de grau analítico como: cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e meios de cultura para fungos leveduriformes e fitopatogênicos foram obtidos comercialmente.

4. MÉTODOS

4.1 Purificação e Avaliação da Toxicidade da SBTX

O protocolo (FIGURA 01) utilizado para extração e purificação de SBTX foi estabelecido por Vasconcelos *et al.* (2008) e usado no presente trabalho para purificação da proteína. Para avaliação de toxicidade da SBTX, através das vias intraperitoneal (i.p) e intravenosa (i.v), foram usados camundongos Swiss. Para avaliação da toxicidade por via i.p., foram considerados válidos apenas os resultados observados no período de 24 horas, enquanto que aquela avaliada por via i.v. até 1 hora de administração (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

4.1.1 Determinação da Pureza da SBTX por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) e Espectrometria de Massas

Para acompanhar o grau de pureza da SBTX ao final do processo de purificação, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida seguindo a metodologia de Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas (12,0 x 17,0 cm). A eletroforese foi realizada em gel vertical de 2 mm de espessura, composto por um gel de aplicação, encerrando 3,5% de acrilamida e 1% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e, por um gel de separação, contendo 17,5 % de acrilamida e 1 % de SDS em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8.

No intuito de confirmar o grau de pureza da toxina, 1 µL de uma solução de SBTX (1 mg/mL) foi aplicada na placa de MALDI e seco à temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa. Os espectros de massa foram obtidos usando-se o equipamento Voyager DE-Pro (*Applied Biosystems*, Darmstadt). O ABI 4700 foi usado no modo refletor MS. O intervalo m/z coberto foi 35000-20000.

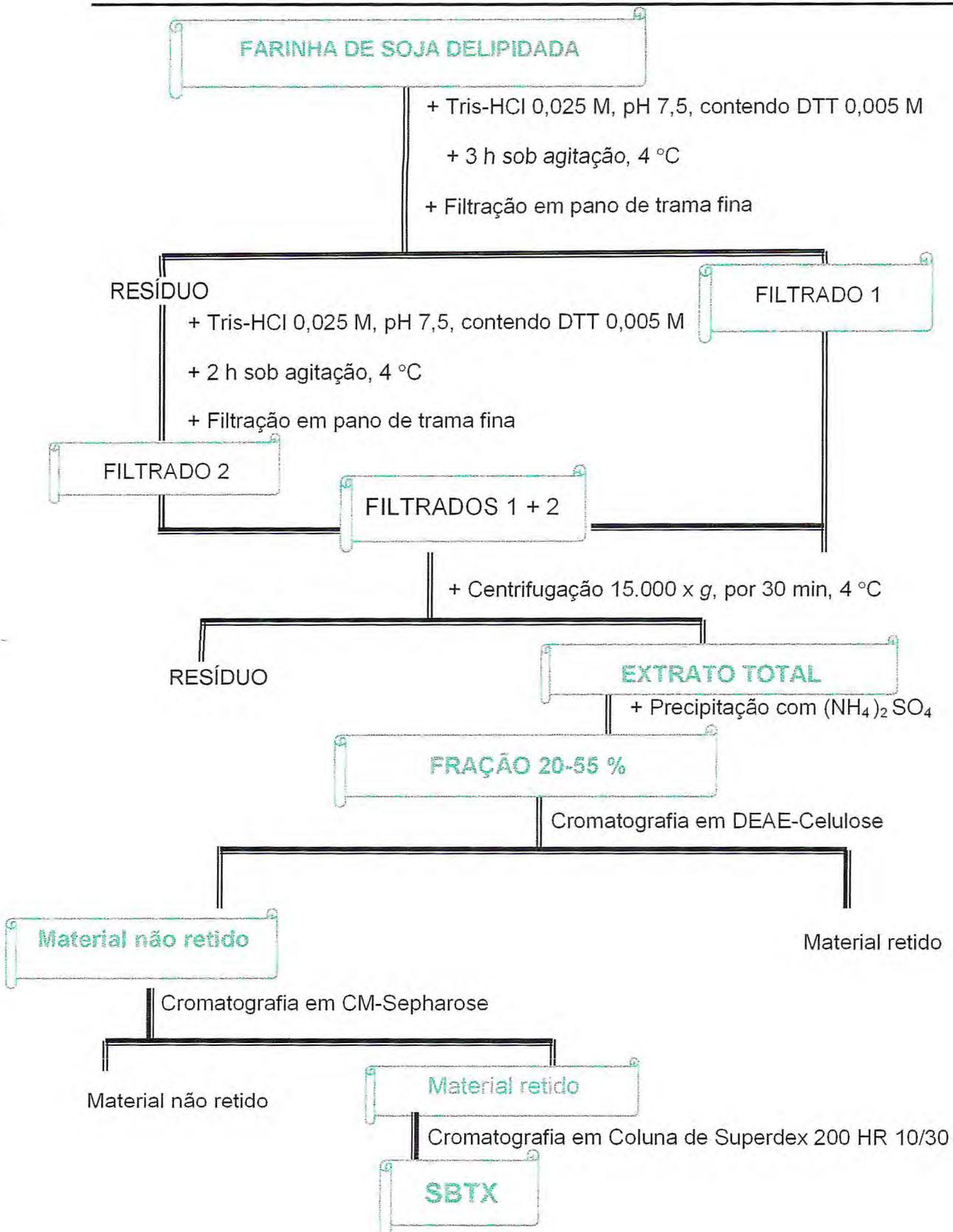


FIGURA 01 - Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX).

4.2 Avaliação da Atividade Antifúngica da SBTX *in vitro*

4.2.1 Obtenção dos Conídios

Após os fungos *C. kikuchii*, *Phomopsis sp.* e *C. gloeosporioides* tomarem todo o diâmetro da placa de Petri (90 mm de diâmetro), cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em capela de fluxo laminar e adicionadas de 10 mL de água estéril. Com a utilização de uma alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície do micélio, foi produzida a suspensão de conídios. Esta foi imediatamente filtrada em malha de nylon, para a remoção de resquícios de hifas, e denominada de solução padrão de conídios. Da solução padrão, foi promovido o ajuste da concentração para $2,0 \times 10^5$ conídios/mL, usados nos ensaios (GIFONI, 2005).

4.2.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Conídios

O efeito da SBTX sobre a germinação dos conídios dos fungos foi avaliado de acordo com o método descrito por Ji e Kúc (1996), adaptado para o uso de placas de germinação (GIFONI, 2005). Uma alíquota de 10 μ L da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foi incubada com 10 μ L de uma solução de SBTX a diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500 μ gP/mL) em Tris HCl 0,025 M. Como controles foram utilizados água estéril, peróxido de hidrogênio 0,1 M, Tris HCl 0,025 M, pH 7,5, e a solução de SBTX após tratamento térmico a 100 °C, por 30 minutos. As placas de germinação foram mantidas a 30 °C, por 12 horas, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico ("Olympus System Microscope BX 60"). Foram considerados germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo de, pelo menos, duas vezes o seu comprimento.

4.2.3 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido

Para avaliação da atividade antifúngica da SBTX em meio líquido contra os fungos citados foi utilizada a metodologia descrita por Freire *et al.* (2002), com algumas modificações. Alíquotas de 10 µL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram incubadas em 100 µL do meio "yeast potato dextrose" (YPD), por 12 horas, a 30 °C, na ausência de luz. Decorrido o tempo de germinação, foram adicionados ao meio 100 µL da solução de SBTX em diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500 µgP/mL) em Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5, previamente filtrada (filtro Millex GV, porosidade de 0,22 µm). As absorbâncias a 630 nm foram lidas a intervalos de 12 horas, até 96 horas após o início do experimento. Como controles foram utilizados Tris-HCl 0,025 M pH 7,5, peróxido de hidrogênio 0,1 M e a toxina após tratamento térmico a 100 °C, por 30 minutos.

4.3 Detecção de SBTX em Folhas de Plantas Jovens e Adultas de Soja

4.3.1 Produção de Anticorpos Policlonais Anti-SBTX

A presença de SBTX em folhas de plantas de soja foi determinada utilizando-se como ferramenta anticorpos policlonais produzidos em coelho contra SBTX. Antes de ser iniciado o processo de imunização, foi coletada uma amostra de sangue dos animais, que foi utilizada para obtenção do soro pré-imune. Em seguida, os animais foram imunizados com uma emulsão contendo 0,5 mg de SBTX, 0,5 mL de NaCl 0,15 M e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund pela via intramuscular. Vinte e um dias após a primeira inoculação, uma nova aplicação de proteína (0,5 mg) foi realizada pela via subcutânea. Decorridos sete dias, foram iniciadas as coletas de sangue para obtenção do soro imune, que foram associadas com imunizações encerrando 0,5 mg de SBTX. As demais coletas e imunizações foram realizadas em intervalos de 7-10 dias. O anti-soro foi precipitado com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação e, em seguida, dialisado em trocas alternadas com água bidestilada e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, a cada 12 horas, durante seis dias. O dialisado foi, então, centrifugado ($15.000 \times g$, 20 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido à cromatografia em coluna de Proteína A - agarose P-2545, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,020 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A eluição do material não retido foi realizada com tampão de equilíbrio, ao passo que o

material retido (rico em IgG policlonal anti-SBTX) foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0, contendo ácido cítrico 0,1 M e, em seguida, dialisado contra água Milli-Q®, concentrado através de liofilização e armazenado a 2 °C.

O título dos anticorpos foi estimado através da metodologia de *Dot Blot*, descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Para isso, 10 µL de SBTX (1 mg/mL em Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5) foram aplicados sobre membranas de nitrocelulose e deixados secar. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução tampão Tris-HCl 0,050 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5%. Subsequentemente, a membrana foi imersa em solução de anticorpo primário anti-SBTX ou soro pré-imune (branco) nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:1500 no tampão de bloqueio e mantida por duas horas a 37 °C. Após essa etapa, a membrana foi lavada por, pelo menos, cinco vezes com o tampão de acoplamento sem o leite em pó desnatado e, então, incubada em presença do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluição 1:100), a 37° C, por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com o mesmo tampão e, por fim, submetida ao processo de revelação com o substrato da fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT).

4.3.2 Obtenção de Plantas Jovens de Soja e Produção dos Extratos Protéicos de Folhas

O plantio de soja, cultivar BRS Pala, foi realizado na casa de vegetação, mantida em temperatura de 25-28 °C e umidade atmosférica variável de 75 a 85% (FIGURA 02). As sementes foram plantadas em vasos plásticos contendo, aproximadamente, quatro litros de solo, sendo colocadas seis sementes por vaso e deixando-se apenas três plantas por vaso após o desbaste. Para os experimentos de imunodeteção de SBTX, as folhas de plantas jovens foram obtidas de espécimes no estágio V4 (cerca de 20 dias após o plantio) e as de plantas adultas no estágio R5 (cerca de 50 dias após plantio) (OLIVEIRA, 2009).

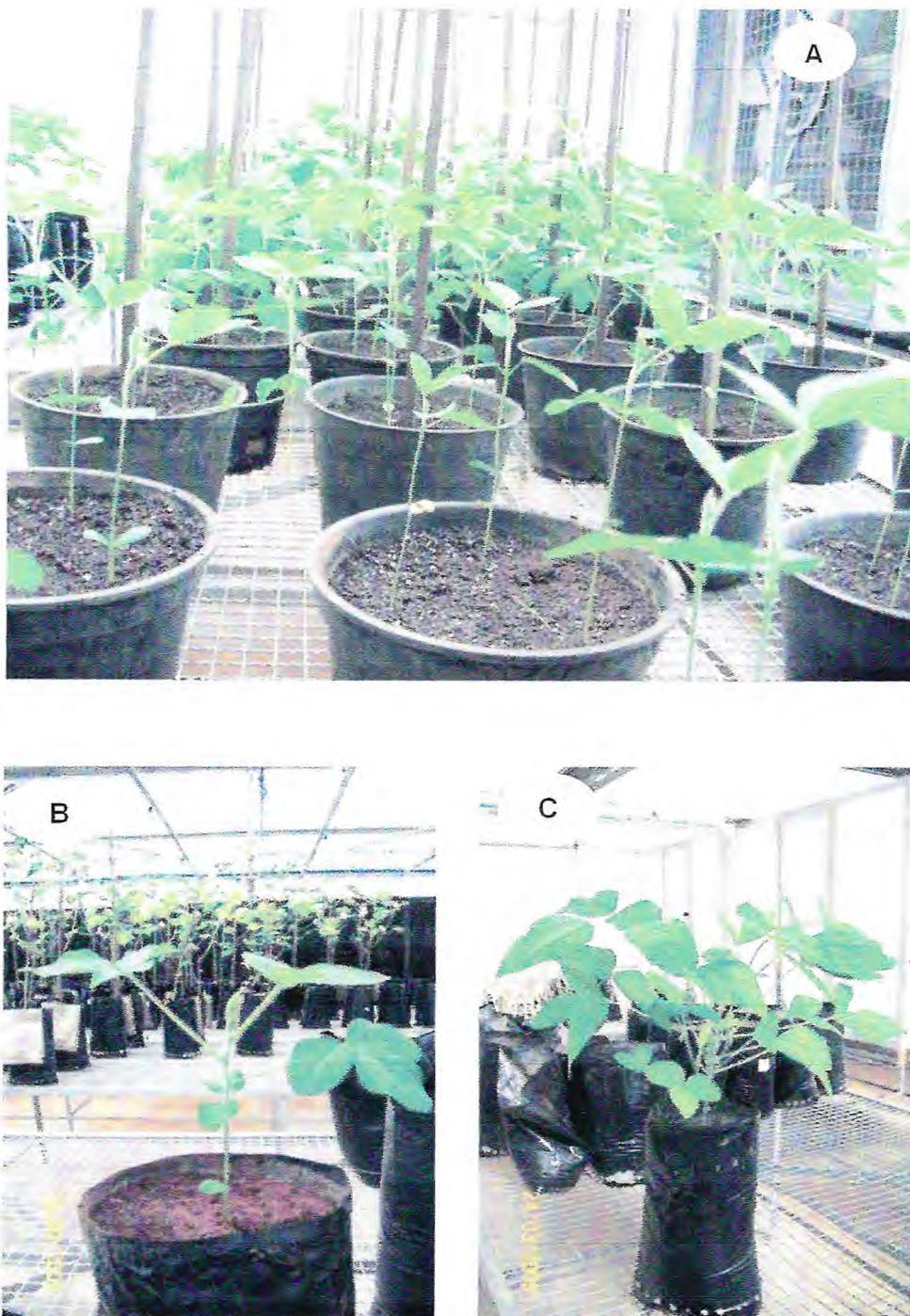


FIGURA 02 - Plantas de soja (cultivar BRS Pala) em casa de vegetação. Em “A” plantas em diferentes intervalos de tempo após o plantio. Em “B” e “C” detalhe das plantas nos estádios V4 (20 DAP) e 50 dias após o plantio (R5), respectivamente, usadas para detecção de SBTX.

Folhas de plantas jovens e adultas foram coletadas em nitrogênio líquido, maceradas e utilizadas para obtenção dos extratos protéicos. As coletas foram realizadas a partir de três plantas de cada vaso, sendo consideradas como uma unidade experimental. Para a quantificação de SBTX nas folhas foram consideradas três unidades experimentais. Os extratos protéicos foram obtidos a partir de quantidades iguais de material vegetal maceradas em nitrogênio líquido. As farinhas de folhas foram colocadas em contato com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8, contendo DTT 0,050 M, EDTA 0,010 M, PMSF 0,001 M e pepstatina a 2,5 μ M, na proporção 1:7 ou 1:13 (p/v; volume mínimo para agitação) para tecidos jovens e adultos, respectivamente, a 4 °C, durante 4 horas e meia de agitação. As suspensões foram centrifugadas (13.000 x g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante, após dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976), foi utilizado para imunodeteccção de SBTX. O restante do extrato foi alíquotado e armazenado a - 20 °C até o uso.

4.3.3 Indução da Expressão da SBTX em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de indução da SBTX, em folhas de plantas adultas submetidas à injúria mecânica, foram utilizadas plantas no estágio R5, provenientes do plantio com sementes de soja, tal como descrito anteriormente. O protocolo experimental foi conduzido de acordo com o descrito por Mason e Mullet (1990), com modificações.

Nesse experimento, as plantas em estágio R5 foram separadas em unidades experimentais, sendo uma unidade experimental composta por nove espécimes diferentes. O grupo controle (testemunha) foi composto por plantas não injuriadas mecanicamente e o grupo experimental por plantas injuriadas. A injúria foi realizada através de corte, com lâmina de bisturi estéril, de cerca de 2 cm na extremidade das folhas de 8 trifólios, dos 16 presentes nas plantas (FIGURA 03). Logo após a injúria, as folhas dos trifólios lesionados de três plantas, e de 8 trifólios não lesionados do grupo testemunha (T 0 h) também de 3 plantas foram removidas. Seis horas após a injúria (T 6 h), 8 trifólios lesionados do grupo experimental (de mais três plantas) e, também, 8 trifólios não lesionados

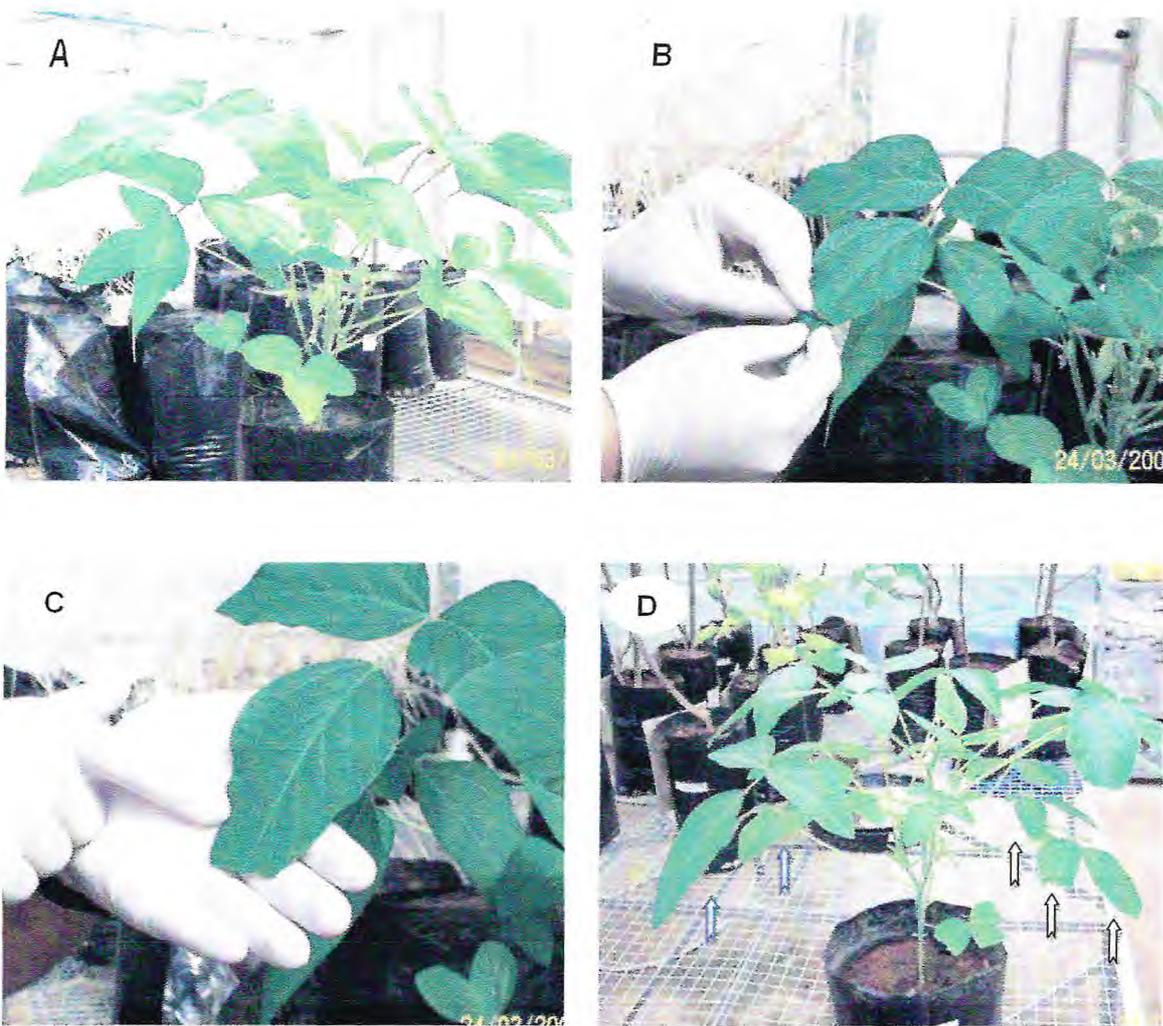


FIGURA 03 - Imagens das plantas de soja utilizadas no experimento de indução por injúria mecânica. Em “A”, plantas adultas no estágio R5, usadas como controles. Em “B” e “C” detalhes do processo de injúria da extremidade das folhas com lâmina de bisturi e das extremidades cortadas de um dos componentes do trifólio. Em “D” visão geral da planta lesionada com destaque para as folhas injuriadas (setas verdes) e não injuriadas (setas azuis) da mesma planta, usadas nos experimentos.

da mesma planta injuriada foram removidos para avaliar se a ocorrência de indução de proteínas era de natureza sistêmica. Nesse mesmo intervalo de tempo, também foram coletadas folhas dos trifólios do grupo testemunha.

Vinte e quatro horas (T 24 h) após a injúria, as três últimas plantas da unidade experimental tiveram suas folhas coletadas tal como descrito para o grupo T 6 h. As folhas foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido e quantidades iguais de tecido utilizadas para extração de proteínas e ensaios de detecção imunológica seguindo todas as etapas experimentais descritas anteriormente. Com o objetivo de verificar modificação nos níveis e perfis protéicos após injúria, amostras de 20 µg de proteínas de cada extrato (T 0 h, T 6 h e T 24 h) foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% (LAEMMLI, 1970), sendo as bandas protéicas coradas com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Os níveis de SBTX detectados em cada grupo foram expressos em função da quantidade de proteínas extraídas.

4.3.4 Detecção e Quantificação de SBTX Através de Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA)

Os níveis de expressão da SBTX em folhas de plantas jovens e adultas foram analisados através de ELISA (“*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) (ROWHANI e FALK, 1995). Para isso, foram utilizados extratos protéicos de folhas. Os teores de proteínas dos extratos obtidos foram determinados pelo método de Bradford (1976).

Inicialmente, os extratos vegetais (antígenos) foram diluídos em tampão de acoplamento (carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) para uma concentração final de 25 µgP/mL. Preparadas as diluições, 100 µL dos diferentes antígenos foram aplicados em poços da placa de microtitulação para impregnação, por um período de 16 horas, 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão PBST (fosfato de sódio 0,1 M, fosfato de potássio 0,010 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05%), por 60 minutos, e, posteriormente, com tampão PBST contendo leite em pó desnatado a 5%, por mais 60 minutos. Feito isso, a placa foi lavada com PBST por mais 60 minutos e, então, incubada com 100 µL de IgG anti-SBTX (diluído 1:1500 em PBST), por 1 hora, a 37 °C. A placa foi novamente lavada com tampão PBST (4 vezes, 10 minutos, cada) e

incubada por 1 hora, a 37 °C, com 100 µL de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:2000 em PBST). Após lavagem da placa com tampão PBST (4 vezes, 10 minutos, cada), 100 µL da solução de revelação, contendo o substrato BCIP/NBT presente na forma de tablete e dissolvido em água grau milli-Q®, seguindo as especificações do fabricante (Sigma), foram aplicados aos poços. A reação foi parada com 50 µL de carbonato de sódio 2 M, após intervalo de 40 minutos, e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BIO-TEK ELX 800), a uma absorbância de 405 nm. O controle negativo consistiu da substituição do anticorpo IgG anti-SBTX pelo soro pré-imune (1:100 em PBST). Os teores de SBTX presentes nos diferentes tecidos foram estimados a partir de uma curva padrão obtida com amostras encerrando concentrações crescentes de SBTX (1 a 25 µg/mL).

4.4 Análise Estatística

Os níveis de expressão e efeito da indução de SBTX em plantas submetidas à injúria mecânica foram analisados através da comparação das médias obtidas de quatro repetições. A diferença entre os tratamentos foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, onde a comparação entre as médias foi feita ao nível de 5%. Foi usado o programa GRAPH PAD PRISM5.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação, Avaliação da Toxicidade e Determinação da Pureza da SBTX por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) e Espectrometria de Massas

SBTX foi obtida a partir do protocolo estabelecido por Vasconcelos *et al.* (2008), resultando em um preparado homogêneo e tóxico. O espectro de massas deconvoluído mostra a presença dos íons 4084.9 e 8169.2 referentes a SBTX em forma de monômero e de um dímero, respectivamente. Os íons 4177.1 e 8354.2 representam a massa da SBTX acrescida de um íon fosfato indicando, possivelmente, a toxina em forma de monômero fosforilado e de um dímero fosforilado, respectivamente (FIGURA 04A). O espectro revela o grau de pureza de SBTX corroborando, assim, com o resultado obtido por SDS-PAGE (FIGURA 04B).

5.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre a Germinação dos Conídios

SBTX não foi capaz de inibir a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* (FIGURA 05) e *Phomopsis sp.* (FIGURA 06) mesmo utilizando a toxina na concentração de 150 µg/mL. Para *C. kikuchii* (FIGURA 07) essa proteína também não foi capaz de inibir sua germinação, entretanto pode-se observar uma redução do crescimento micelial desse fungo na presença da toxina quando comparado com o controle, sinalizando que a toxina inibiu essa fase do desenvolvimento de *C. kikuchii* já na concentração de 50 µg/mL.

5.3 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento Celular de Fungos em Meio Líquido

Muito embora SBTX não tenha sido capaz de inibir a germinação de *C. kikuchii* (FIGURA 07), a toxina inibiu o crescimento celular desse fungo já na concentração de 50 µg/mL (FIGURA 08). Entretanto, não foi capaz de inibir o

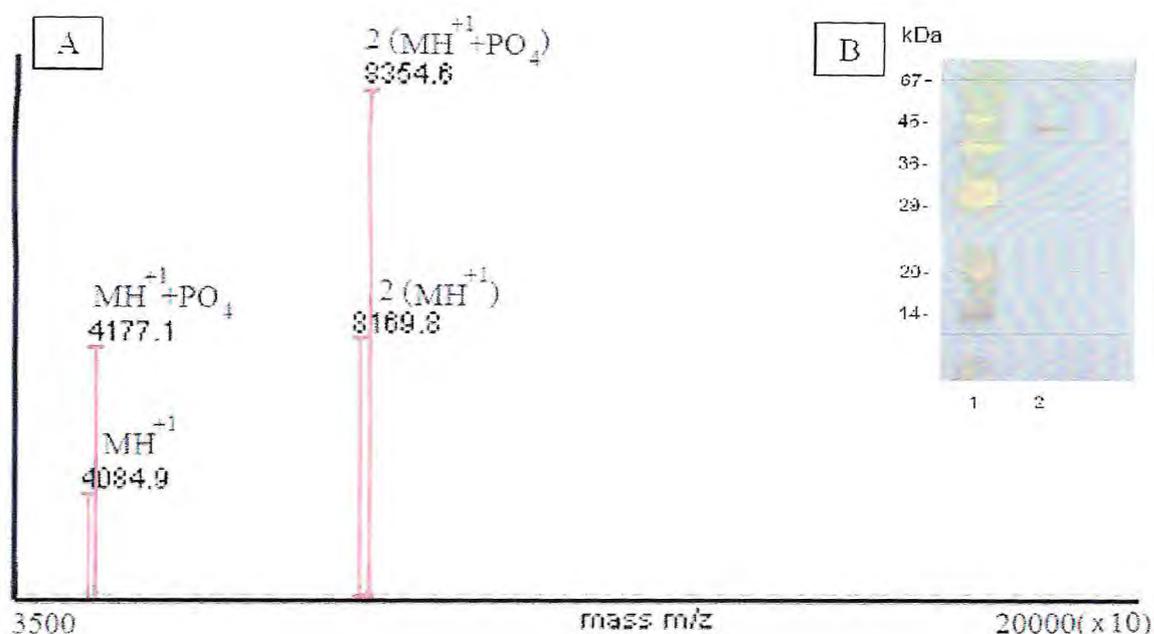


FIGURA 04 – (A) Espectrometria de massas de SBTX mostra a presença de um dímero de massa de 83 kDa e de um monômero de 42 kDa. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida da SBTX na ausência de β -mercaptoetanol, revelada com prata. Raia 1 – Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina – 67,0 kDa; albumina do ovo – 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – 36,0 kDa; anidrase carbônica – 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 kDa e α -lactoalbumina – 14,2 kDa). Raia 2 – SBTX.

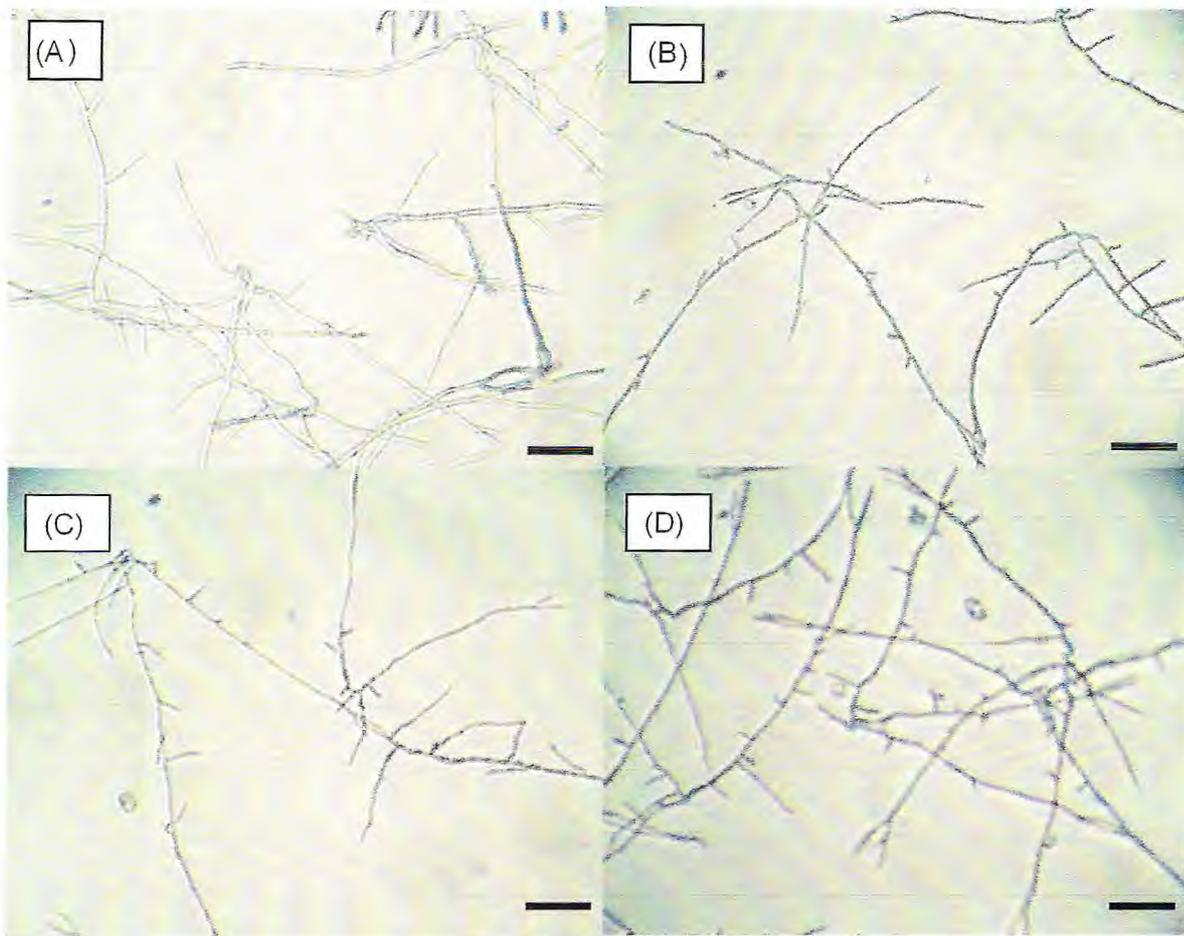


FIGURA 05 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* incubados com Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 (A) e com SBTX em concentrações crescentes de 50 µgP/mL (B), 100 µgP/mL (C) e 150 µgP/mL (D) Barra = 2,5 µm.

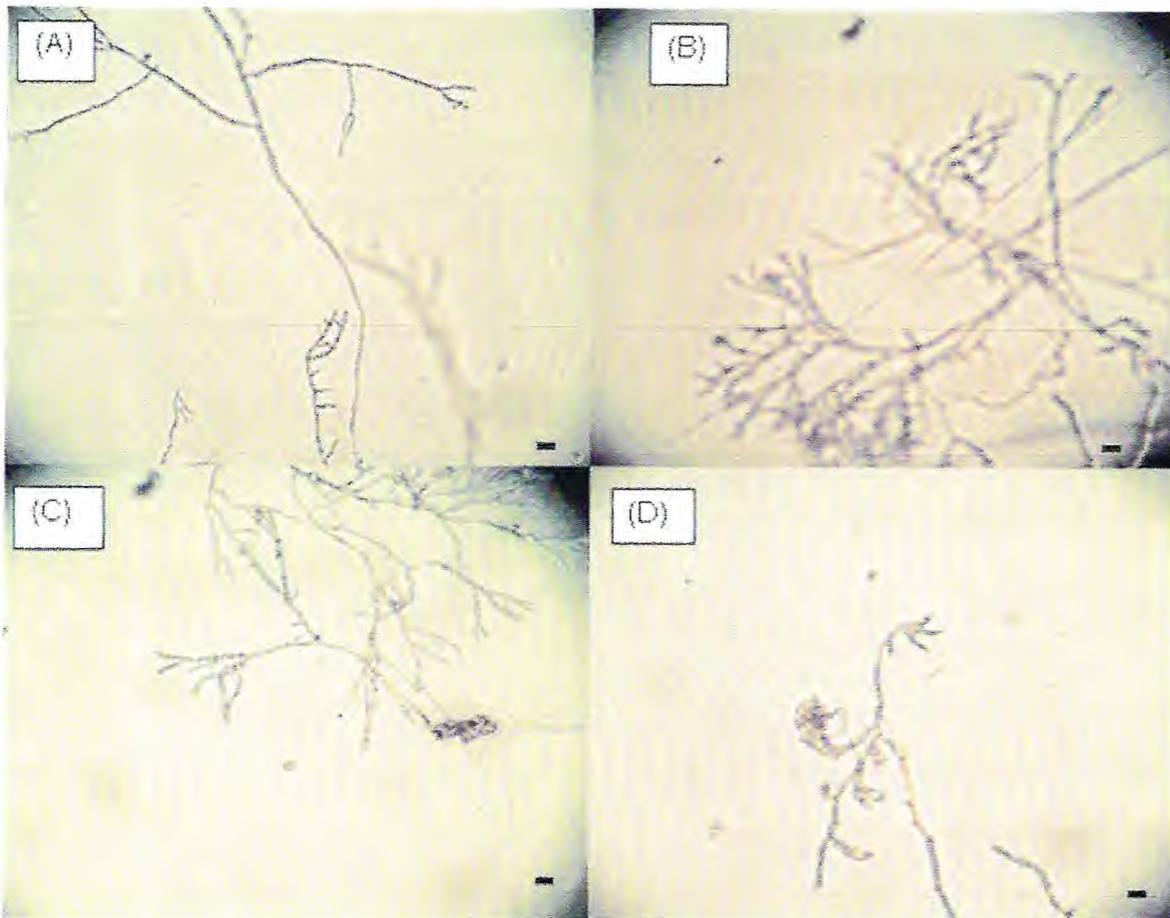


FIGURA 06 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Phomopsis sp.* incubados com Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 (A) e com SBTX em concentrações crescentes de 50 µgP/mL (B), 100 µgP/mL (C) e 150 µgP/mL (D) Barra = 2,5 µm.

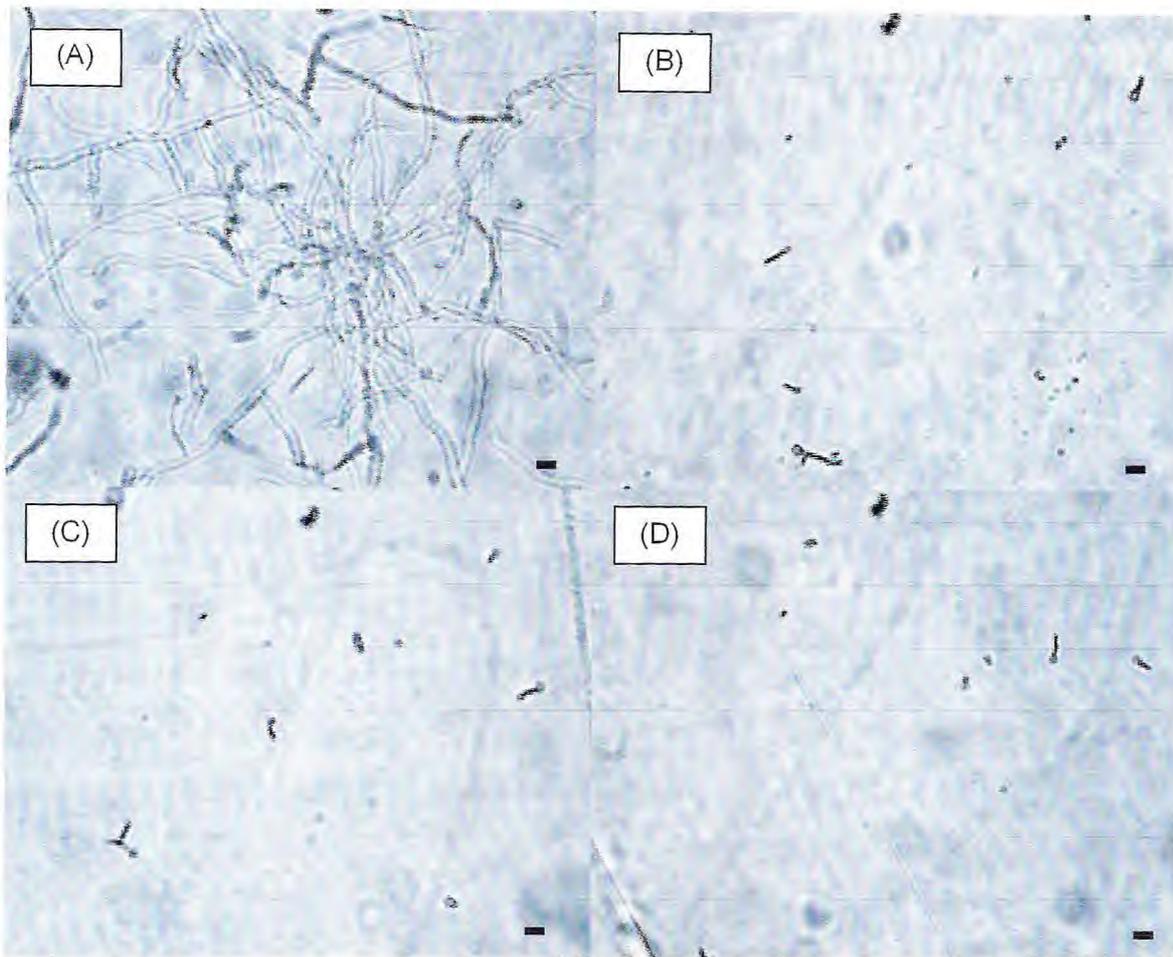


FIGURA 07 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Cercospora kiuchii* incubados com Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 (A) e com SBTX em concentrações crescentes de 50 µgP/mL (B), 100 µgP/mL (C) e 150 µgP/mL (D) Barra = 2,5 µm.

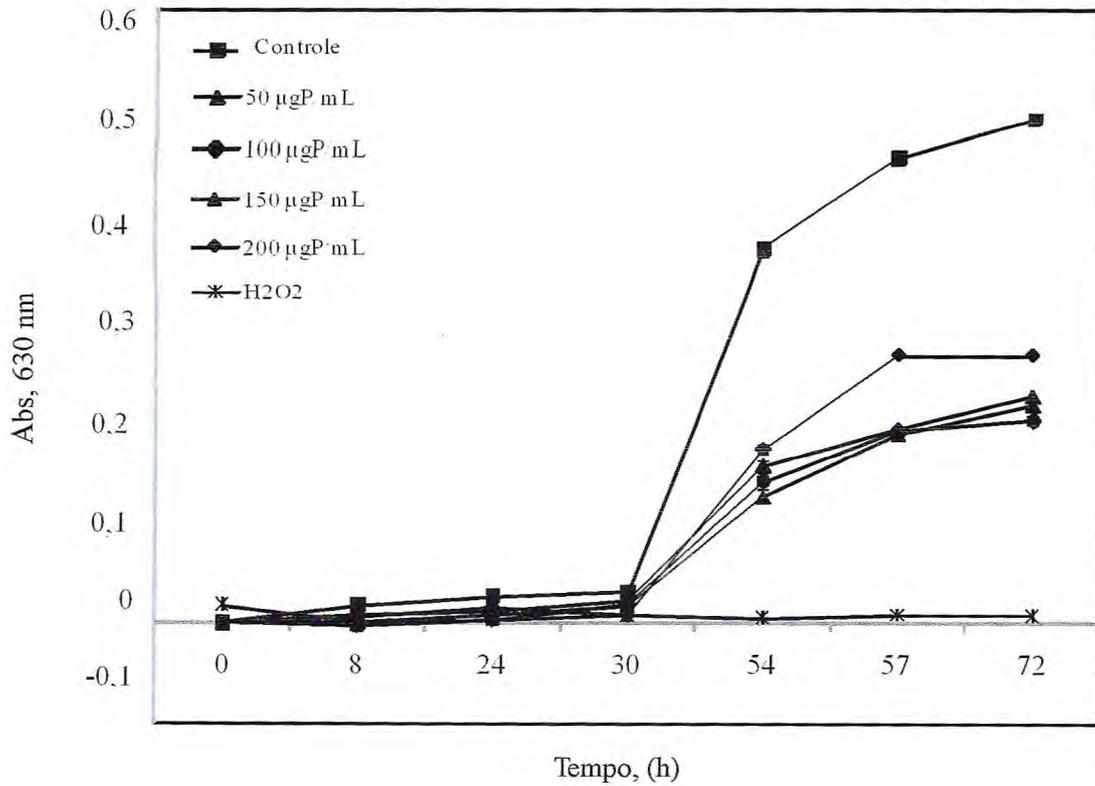


FIGURA 08 - Teste do crescimento de *Cercospora kikuchii* em meio líquido (YPD - "yeast potato dextrose") na presença de SBTX em diferentes concentrações.

crescimento de *C. gloeosporioides* (FIGURA 05), *Phomopsis* sp. (FIGURA 06), mesmo na concentração de 150 µg/mL.

5.4 Detecção de SBTX em Folhas de Plantas Jovens e Adultas de Soja

Dentro das condições experimentais utilizadas, o processo de extração levou a obtenção de um conteúdo de proteínas totais nas folhas jovens de $4,13 \pm 0,38$ mgP/mL e nas folhas adultas de $6,23 \pm 0,38$ mg/mL.

Em relação à detecção e quantificação de SBTX nas folhas de soja, foi observado que, em folhas jovens, os níveis da toxina foram maiores do que em folhas adultas como mostra a Figura 09. Nas folhas jovens, foram detectados $35,08 \pm 0,57$ µg de SBTX/mg de proteína extraída, ao passo que em folhas adultas o nível observado foi de $18,60 \pm 2,89$ µg de SBTX/mg de proteína extraída. Sendo assim, foi observado um teor mais de duas vezes maior na expressão de SBTX em folhas jovens em relação às folhas adultas.

5.5 Indução da Expressão de SBTX em Plantas Adultas Submetidas à Injúria Mecânica

Sabendo que o nível de expressão de SBTX é maior em plantas jovens, o próximo passo foi avaliar se seu conteúdo em folhas adultas poderia ser aumentado após injúria mecânica. Vale ressaltar que, o processo de indução da expressão através da injúria mecânica foi avaliado sob dois aspectos: 1 – alteração dos níveis de SBTX em regiões adjacentes ao local da lesão e, 2 – em folhas não lesionadas da mesma planta, para verificar se a ocorrência de alteração nos níveis de toxina seria sinalizada sistemicamente.

Observando-se o perfil eletroforético dos extratos das folhas lesionadas e não lesionadas (FIGURA 10), podem ser notadas algumas diferenças nos níveis de expressão de algumas proteínas, a saber: nas plantas controle, aparentemente, não houve alteração no perfil de proteínas extraídas nos tempos de 0, 6 e 24 horas. Na eletroforese, foi detectada a presença de bandas protéicas distribuídas principalmente na zona de massas moleculares entre 82 e 26 kDa.

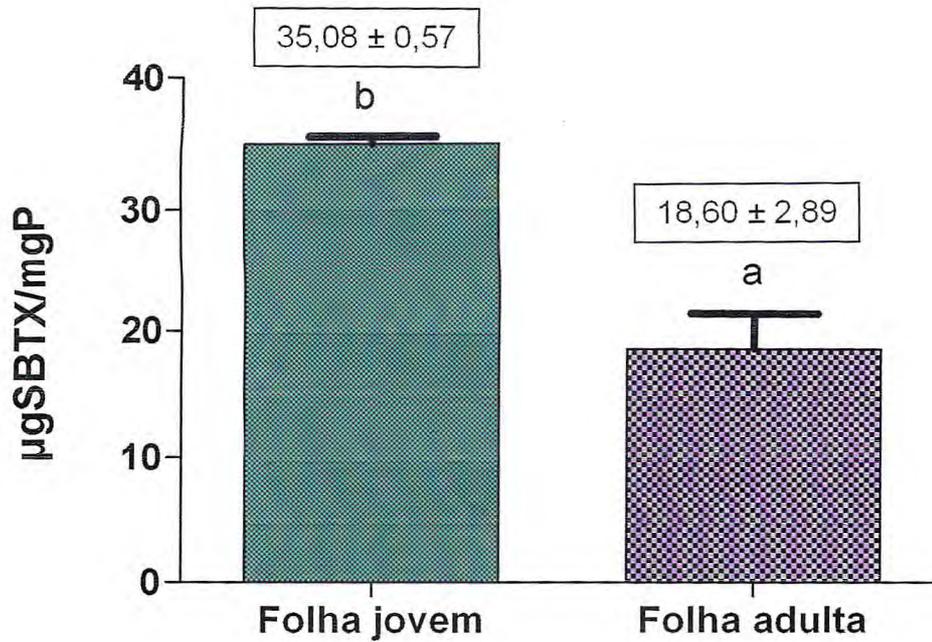


FIGURA 09 - Níveis de SBTX ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína extraída) detectados em folhas jovens e adultas de soja (estádio V4 e 50 DAP) obtidos através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a toxina (diluição 1:1500; v/v). Letras diferentes representam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

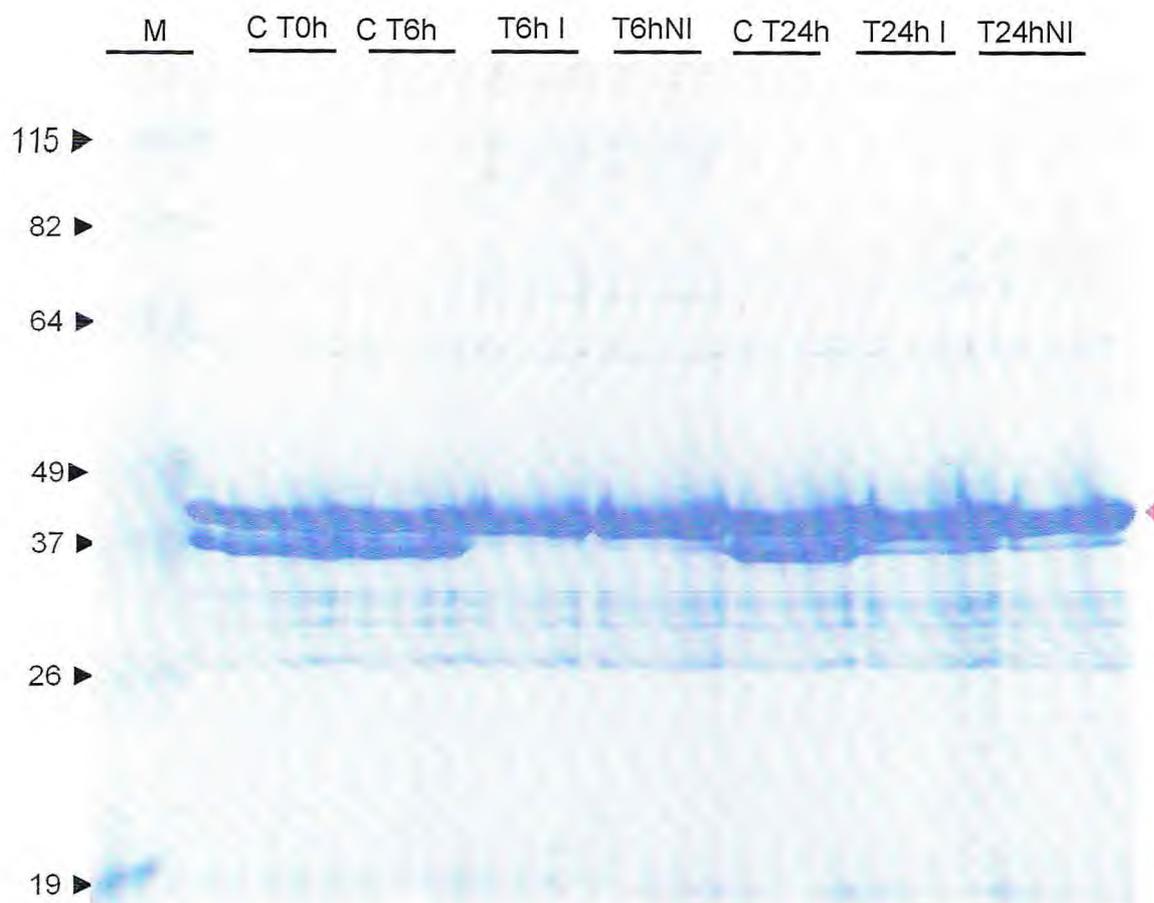


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) dos extratos totais de folhas de soja (R5) submetidas ou não à injúria mecânica. Os grupos experimentais são indicados na parte superior de cada raia. As amostras foram preparadas em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol 1%, sendo aplicados cerca de 40 μ g de proteínas por poço. As massas dos marcadores são mostradas em kDa. (◄) indica proteína de massa molecular aproximada de 44 kDa, conforme determinado pela análise do gel. Legenda: "C": controle; Th: tempo em horas; "I": tecido injuriado; "NI": tecido não injuriado.

Seis horas após a lesão, o perfil protéico foi alterado não apenas nas folhas submetidas à injúria, mas também em folhas não submetidas à injúria da mesma planta, mostrando que ocorrem mudanças nos níveis de expressão de algumas proteínas, sendo essas mudanças de natureza sistêmica. Na eletroforese, é observado o aparecimento de bandas entre 115 e 82 kDa (não detectadas no grupo controle), bem como o desaparecimento ou diminuição de uma banda na altura de 37 kDa, que era bastante proeminente no controle.

Seis horas após injúria mecânica, foi observado aumento significativo dos níveis da toxina que passaram de $35,08 \pm 0,57 \mu\text{g}$ de SBTX/mg de proteína extraída para $43,26 \pm 1,66 \mu\text{g}$ de SBTX/mg de proteína extraída. Já com vinte e quatro horas após injúria mecânica, foi observado aumento significativo de praticamente seis vezes nos níveis da toxina que passaram de $35,08 \pm 0,57 \mu\text{g}$ de SBTX/mg de proteína extraída para $209 \pm 2,38 \mu\text{g}$ de SBTX/mg de proteína (FIGURA 11). Houve alteração também nos níveis de SBTX em folhas da mesma planta que não foram submetidas diretamente à injúria, mostrando que SBTX é sinalizada sistemicamente.

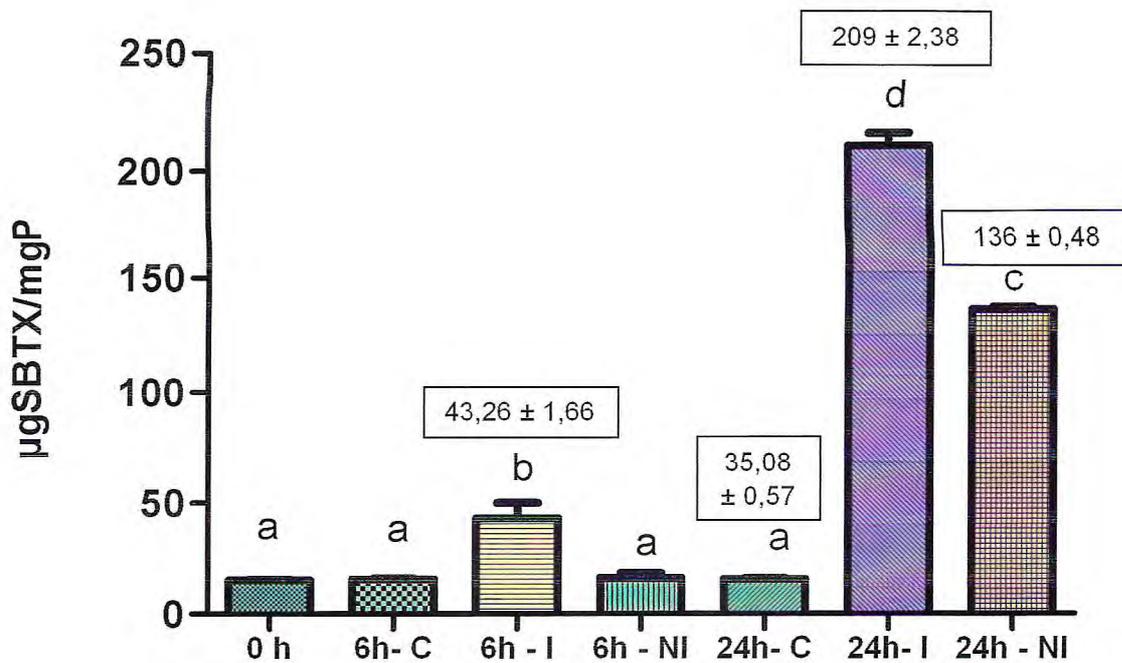


FIGURA 11 - Aumento nos níveis teciduais de SBTX através de indução por injúria mecânica. A quantificação de SBTX nos extratos de folhas adultas foi determinada através da técnica de ELISA indireto usando anticorpos policlonais contra a toxina na diluição de 1:1500. Letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes de SBTX ($p < 0,05$, Teste de Tukey). Legenda: C – controle; I – tecido injuriado; NI – tecido não injuriado.

6. DISCUSSÃO

As perdas provocadas por doenças fúngicas constituem um dos principais fatores limitantes não só da cultura da soja, mas também de outras culturas de importância agrônômica no mundo (PELEGRINI *et al.*, 2009, EMBRAPA, 2010). Somente *Cercospora kikuchii* pode provocar perdas dos rendimentos de 45% de acordo com o potencial produtivo da cultura de soja (RODRIGUES, 2009).

A busca de peptídeos e proteínas antifúngicas é contínua, pois essas proteínas podem ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas no controle desses organismos, tendo o potencial de impedir perdas econômicas massivas, uma vez que plantas transgênicas expressando proteínas antifúngicas são esperadas ser resistentes a infecções por fungos (PARK *et al.*, 2007; PELEGRINI *et al.*, 2009).

O primeiro indício de que SBTX poderia ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica no controle de fungos fitopatogênicos foi observado por Siebra (2004), ao detectar o efeito inibitório exercido por essa toxina sobre o crescimento de *C. sojina* Hara. Posteriormente, estudos complementares feitos por Morais (2007) revelaram a ação tóxica dessa proteína contra a germinação dos conídios de *Aspergillus niger* e *Penicillium herquei*. Diante desses dados, a pesquisa aqui realizada teve como um dos focos principais o conhecimento do espectro de ação dessa toxina contra fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles patogênicos a soja. Além disso, foi avaliada a ocorrência ou não de indução em folhas adultas por injúria mecânica.

Assim, o primeiro passo dessa etapa foi purificar e analisar o grau de pureza da SBTX. Como pode ser observado na Figura 04A, que mostra a presença dos íons 4177.1 e 8354.3 referentes a SBTX em forma de monômero fosforilado e de dímero fosforilado, respectivamente, a toxina mostrou-se com elevado grau de pureza, o que foi corroborado por PAGE-SDS (FIGURA 04B). De fato, Oliveira (2009) utilizando ferramentas de bioinformática verificou que foram identificados onze sítios potenciais de fosforização na seqüência de aminoácidos deduzida para SBTX. Os resultados de purificação estão de acordo com Vasconcelos (2008), que verificou por PAGE-SDS também a presença da forma dimérica da proteína, quando a amostra foi submetida à corrida sem β -

mercaptoetanol. Ademais, a toxicidade para camundongos esteve presente em todas as preparações.

De posse da SBTX pura e tóxica, o próximo passo foi, então, avaliar o espectro de ação da SBTX contra fungos patogênicos à soja como *C. kikuchii*, *Phomopsis sp.* e *C. gloeosporioides*, além de verificar em qual etapa do desenvolvimento fúngico essa proteína estaria atuando. SBTX não foi capaz de inibir a germinação dos conídios e o crescimento dos fungos *C. gloeosporioides* e *Phomopsis sp* (FIGURAS 05 e 06). A toxina não foi capaz de inibir a germinação dos conídios de *C. kikuchii* (FIGURA 07), entretanto SBTX inibiu o crescimento desse fungo já na concentração de 50 µgP/mL (FIGURA 08). Assim, uma vez que *C. kikuchii* causa perdas no potencial de produção de cerca de 45%, a inibição do crescimento micelial desse fungo por SBTX, pode reduzir essas perdas. A inibição verificada contra *C. kikuchii* está de acordo com aquela obtida por Siebra (2004), tendo demonstrado que SBTX foi capaz de inibir o crescimento de *C. sojina* na concentração de 50 µg/mL, mostrando, assim, que espécies desse gênero são mais susceptíveis a essa toxina. De fato, Becker-Ritt e colaboradores (2007) verificaram que o gênero *Trichoderma* mostrou-se mais sensível à urease de soja, uma vez que essa proteína inibiu o crescimento de três espécies desse gênero. Além disso, a concentração usada na verificação dos efeitos antifúngicos da SBTX é cerca de 112 vezes menor do que aquela encontrada para causar neurotoxicidade em camundongos, por via intra peritoneal (VASCONCELOS *et al.*, 2008).

Muito embora algumas proteínas sejam capazes de inibir ambas as etapas do desenvolvimento fúngico, como é o caso de uma PR4 de trigo, que inibe tanto a germinação como o crescimento de *F. culmorum* na concentração de 75 µg/mL (BERTINI *et al.*, 2009), existem também aquelas que inibem apenas uma única fase do desenvolvimento. Becker-Ritt e colaboradores (2007) mostraram que a urease de soja foi capaz de inibir somente a germinação de *F. solani*, não exercendo nenhum efeito no crescimento desse fungo mesmo utilizando uma concentração de 1,15 µM. Já Melo e colaboradores (2005) verificaram que a lectina (250 µgP/mL) de *L. auriculata* foi capaz de inibir o crescimento das hifas dos fungos *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *A. niger*, entretanto não apresentou qualquer efeito sobre a germinação dos esporos.

Há, ainda, proteínas e peptídeos antifúngicos que podem inibir somente uma ou duas de muitas espécies de fungos testados (YE; NG, 2009). Por exemplo, a urease de soja não foi capaz de inibir o crescimento das hifas de *F. solani* e *T. viride*, entretanto a proteína foi capaz de inibir o crescimento de *Curcuvilaria lunata*, *P. herguei*, *Trichoderma sp.* e *T. pseudokoningii* na concentração de 0,57 μM (BECKER-RITT *et al.*, 2007). Uma PR10 recombinante de *Arachis hypogaea* exibiu efeito inibitório sobre o crescimento das hifas de *F. oxysporum* e *R. solani*, entretanto não se mostrou ativa para *Sclerotium rolfsii*, *A. flavus*, *A. niger* e *Phytophthora infestans*. As concentrações de proteína necessárias para inibir 50% do crescimento fúngico foram 12,5 e 100 $\mu\text{gP/mL}$ para o *F. oxysporum* e *R. solani*, respectivamente (CHADHA; DAS, 2006). Uma deoxiribonuclease isolada de sementes de *Asparagus officinalis* inibiu o crescimento de *Botrytis cinera*, mas não inibiu o crescimento de *F. oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (WANG; NG, 2001).

É sabido que a composição química da parede celular dos fungos pode variar dependendo se forem analisados o soma (hifa ou levedura), as estruturas reprodutivas (esporangióforos) ou os esporos (BARTINIK-GARCIA, 1968; FEOFILOVA *et al.* 2006; MENEGASSI *et al.*, 2008). Assim, é possível que o efeito inibitório da SBTX, observado apenas sobre o crescimento de *C. kikuchii*, seja devido a essa diferença na composição da parede celular.

Tendo o conhecimento que *C. kikuchii* é um fungo que ataca folhas de soja, o próximo passo foi avaliar se SBTX estaria presente nesses órgãos jovens (estádio V4) e/ou adultos (estádio R5). Nas folhas jovens foram detectados $35,07 \pm 1,68 \mu\text{g}$ de SBTX/mgP, ao passo que em folhas adultas o teor observado foi de $16,23 \pm 0,35 \mu\text{g}$ de SBTX/mgP (FIGURA 09). Esses resultados estão de acordo com os observados por Siebra (2004), que verificou o acúmulo da SBTX em folhas estioladas de soja, muito embora a toxina estivesse presente também em outros órgãos como raízes, cotilédones e caules, e corroboram também com os resultados de Oliveira (2009), que encontrou a presença de EST para SBTX também em folhas.

Em relação a Gm-TX, outra toxina presente em sementes de soja, foram detectados $1,38 \pm 0,25 \mu\text{g}$ de Gm-TX/mgP em folhas jovens e $0,75 \mu\text{g} \pm 0,01$ de Gm-TX/P em folhas de plantas adultas (OLIVEIRA, 2009). Sendo assim, os teores detectados de SBTX em folhas jovens foram cerca de 25 vezes maiores do que

aqueles encontrados para Gm-TX e, em relação aos níveis detectados de SBTX em folhas adultas, esses foram cerca de 21 vezes maiores do que aqueles observados para Gm-TX. Essas diferenças dos níveis de expressão das duas toxinas em folhas devem estar relacionadas com o papel fisiológico que cada uma desempenha. De fato, em plantas jovens, Gm-TX está presente nas raízes em teores quase dez vezes superiores àqueles detectados nas folhas. Nesses últimos órgãos a expressão da Gm-TX se altera, quando consideradas as plantas adultas. Entretanto, na raiz o nível de expressão em plantas adultas é triplicado, sugerindo que essa proteína exerce algum papel biológico relacionado à sua presença nesse órgão. Esse dado é corroborado com o achado experimental que, *in vitro*, Gm-TX foi capaz de induzir mortalidade de 85% das formas infectivas de *M. incognita* Raça 4 (J2), quando esses nematóides foram incubados por apenas 6 horas com a toxina e de 100% após 24 horas de incubação (OLIVEIRA, 2009). Os níveis de SBTX serem cerca de duas vezes maiores em plantas jovens do que em adultas pode estar relacionado ao papel desempenhado por essa proteína na defesa da planta não apenas contra fungos, mas também contra insetos, uma vez que foi também encontrada atividade inseticida dessa toxina contra *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus* (SIEBRA, 2004). De fato, a lagarta-da-soja inicia o seu desenvolvimento na cultura da soja em plantas jovens (EMBRAPA, 2010).

Uma vez que *C. kikuchii* juntamente com o fungo *S. glycines* causam doenças foliares de final de ciclo, ou seja, quando a planta se encontra no estágio R5, e que SBTX apresenta maiores níveis em folhas jovens, o passo seguinte do trabalho foi, então, avaliar se o conteúdo de SBTX seria aumentado em folhas de soja adultas através de injúria mecânica. Vinte e quatro horas após injúria mecânica foi observado um aumento de praticamente seis vezes nos teores de SBTX que passou de $35,07 \pm 1,68 \mu\text{g}$ de SBTX/mgP para $209 \pm 2,38 \mu\text{g}$ de SBTX/mgP (FIGURA 10). Oliveira 2009 verificou que para Gm-TX, seis horas após injúria mecânica, foi observado um aumento significativo de quase duas vezes no teor dessa proteína que passou para $1,66 \pm 0,03 \mu\text{gP}$ de Gm-TX/mgP (OLIVEIRA, 2009). Um aumento nos níveis de expressão também foram verificados para uma lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia* que apresentou maior atividade específica após 72 horas de injúria mecânica, passando de 400 UH/mgP para cerca de 650 UH/mgP (SALES, 2008). A injúria mecânica em folhas

adultas de *Theobroma cacao* (cacau) levou a um aumento dos níveis de transcritos para uma quitinase de 2,75 e 5,78 vezes em relação ao controle após 4 e 20 horas de injúria, respectivamente (BAILEY *et al.*, 2005).

A injúria de tecidos vegetais tem sido responsável pela indução de respostas moleculares complexas, muitas das quais consideradas respostas de defesa da planta (ANEJA; GIANFAGNA, 2001). A forma de injúria, se apenas mecânica ou combinada com outros componentes, tais como saliva do inseto é crítica para determinar a resposta de defesa da planta (REYMOND *et al.*, 2000; ARIMURA *et al.*, 2002). A injúria pode levar a formação de jasmonato e etileno, cada um capaz de induzir vias de transdução de sinal que levam à resistência contra pragas. Ácido jasmônico e o metil jasmonato são parte da via do ácido octadenoide em plantas (STRASSNER *et al.*, 2002; WASTERNAK e HAUSE, 2002) e, em algumas ocasiões, contribuem para a resistência aos insetos (MCCONN *et al.*, 1997; BALDWIN, 1998) e patógenos (THOMMA *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2001). Jasmonatos funcionam como reguladores de vários diferentes genes de defesa vegetal (BAILEY *et al.*, 2005). Sendo assim, o tratamento de folhas de soja com injúria mecânica pode ter levado a formação de jasmonato e este, por sua vez, ter regulado o aumento da expressão de SBTX. De fato, o tratamento de sementes de soja por 24 horas com ácido jasmônico levou ao aumento dos níveis de SBTX (MORAIS, 2007). Esses dados reforçam ainda mais a participação dessa proteína na defesa vegetal.

Além da SBTX ter sido verificada em folhas submetidas à injúria mecânica, houve alteração também nos níveis dessa toxina em folhas da mesma planta não injuriadas, mostrando que essa proteína é sinalizada sistemicamente (FIGURA 11). Há relatos que em folhas injuriadas o ácido jasmônico serve como molécula sinalizadora para ativar respostas de defesa sistêmica e em folhas não injuriadas a produção de outra molécula sinalizadora, que não seja o ácido jasmônico, ativa a síntese do mesmo em tecidos de forma sistêmica (KOO; HOWE, 2009).

Os resultados encontrados até o momento, que SBTX é uma proteína ativa contra fungos fitopatogênicos e insetos e é induzida após injúria mecânica e tratamento com ácido jasmônico, nos leva a hipotetizar que SBTX pode integrar o conjunto de proteínas relacionadas à patogênese (PRs-proteínas). De fato, PR proteína é um termo definido para indicar que essas proteínas podem ou não ser detectadas em concentrações basais nos tecidos saudáveis, mas sua

acumulação normalmente ocorre em condições patológicas e situações relacionadas com pelo menos duas ou mais combinações de patógeno (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A expressão "condições patológicas" é usada para indicar ataque de diferentes origens de patógeno, incluindo fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros. Já situações relacionadas incluem a aplicação de produtos químicos que imitam o efeito do ataque do patógeno, por exemplo, etileno (ET), ácido jasmonato (JA) e salicílico (SA), e as respostas de injúria mecânica (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; SELS *et al.*, 2008).

7. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

A toxina da soja é uma forte candidata a ser utilizada como ferramenta biotecnológica no controle de fungos fitopatogênicos, particularmente do *C. kikuchii* e *C. sojina*. Os dados a favor desta afirmativa são: 1) O efeito inibitório exercido por essa proteína sobre o crescimento desses fungos; 2) A sua baixa concentração inibitória frente aos fungos citados, em torno de 112 vezes menor do que aquela letal para camundongos e 3) A sua indução por injúria mecânica, denotando seu potencial de atuação na defesa vegetal.

8. PERSPECTIVAS DO CAPÍTULO

Uma possibilidade de dar continuidade às investigações aqui iniciadas seria avaliar o comportamento da SBTX diante do tratamento de plantas jovens e adultas com ácido jasmônico, verificando os níveis de transcritos para essa proteína em todos os órgãos da planta, uma vez que seu cDNA se encontra caracterizado. Outra possibilidade seria avaliar se a indução de SBTX pelo tratamento com esse elicitor promoveria uma maior proteção da soja contra o ataque de fungos fitopatogênicos, reduzindo assim a severidade das lesões provocadas por esses organismos.

CAPÍTULO 3

SBTX E AVALIAÇÃO DE SEU MECANISMO DE AÇÃO ANTIFÚNGICO

1. CARACTERIZACAO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Durante a última década, muitos estudos estiveram centrados na análise de proteínas antifúngicas de diferentes fontes vegetais, pelo valor econômico que elas agregam devido à sua capacidade em proteger culturas importantes do ataque desses patógenos (PARK *et al.*, 2007). De fato, plantas transgênicas expressando proteínas antifúngicas têm maior resistência a doenças fúngicas (OARD; ENRIGHT, 2006; TOBIAS *et al.*, 2007). Além disso, muitos desses organismos causam também infecções em humanos, um sério problema mundial, principalmente com o aumento da resistência de bactérias e fungos a fármacos (PELEGRINI *et al.*, 2009).

Proteínas antifúngicas têm sido isoladas de um grande número de espécies de leguminosas (NG, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Sendo que para seu uso biotecnológico ser explorado, essas proteínas devem exibir algumas características, tais como apresentar atividade contra várias espécies de fungos, possuir uma concentração inibitória baixa, ser capaz de minimizar o aparecimento de resistência do patógeno e ter mecanismo de ação conhecido (OARD e ENRIGHT, 2006). Sendo assim, ferramentas biológicas, bioquímicas e moleculares têm sido utilizadas para melhor compreender o modo de atuação dessas proteínas.

Para investigação do mecanismo de ação de proteínas antifúngicas, leveduras têm sido utilizadas. Existem várias propriedades inerentes às leveduras, que as fazem um bom modelo de organismos eucariotos, uma vez que são microorganismos unicelulares, de fácil manipulação genética, apresentam disponibilidade de mutantes, e possuem genoma completo seqüenciado, disponível em bancos de dados (NIELSEN, 2009).

Aliado ao uso de leveduras, um grande número de tecnologias têm sido usadas para a análise da expressão gênica, no intuito de ter uma visão ampla de como essas células regulam seus genes na presença de compostos tóxicos. Dentre essas tecnologias, destaca-se o uso de microarranjos de DNA, que faz uma varredura da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, ou seja, uma avaliação da expressão gênica em larga escala num único experimento (REYMOND *et al.*, 2001; STOUGHTON, 2005; KERSCHGENS *et al.*, 2009).

Diante do exposto e na perspectiva de ter uma aplicação biotecnológica para a SBTX, como uma proteína antifúngica ativa contra *C. kikuchii*, *C. sojae*, *P. herquei* e *A. niger*, foram utilizadas leveduras como modelo e a técnica de microarranjos de DNA para análise, visando melhor compreender o mecanismo pelo qual essa proteína exerce sua atividade. Para isso, as atividades propostas nesse capítulo têm como eixo os seguintes questionamentos:

1. *Visando seu aproveitamento biotecnológico, seria a SBTX um antifúngico com atuação na parede e/ou membrana celular?*
2. *Seria a SBTX ainda capaz de promover alteração no padrão de expressão gênica no patógeno?*

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Utilizando as leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como diferentes abordagens experimentais, colaborar para elucidação do mecanismo de ação da SBTX frente a esses organismos, no intuito de inferir, posteriormente, um possível mecanismo de ação da toxina contra fungos fitopatogênicos.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade de SBTX sobre o crescimento de diferentes leveduras;
- Verificar se SBTX é um antifúngico que atua na membrana e/ou parede celular de leveduras;
- Analisar o padrão de expressão gênica de células de *Candida albicans* SC5314 tratadas com a toxina da soja através da técnica de microarranjos de DNA;
- Validar os genes induzidos por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR);
- Avaliar a atividade de SBTX no crescimento de *C. albicans* mutantes nos genes *RIM101* e *TUP1*.

3. MATERIAIS

3.1 Sementes de Soja

Tal como descrito no capítulo anterior, nesta etapa foram também utilizadas sementes de soja, cultivar IAC-24, fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo, Brasil.

3.2 Fungos Leveduriformes

As espécies de leveduras *Candida albicans* (CE022), *Candida parapsilosis* (CE002), *Pichia membranifaciens* (CE015) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram obtidas da micoteca do Laboratório de Microbiologia da UFC. *C. albicans*, *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas por possuírem genoma já seqüenciado e *P. membranifaciens* por se tratar de uma levedura fitopatogênica. As cepas foram mantidas em meio de cultura ágar Sabouraud e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos, do Centro de Bociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Os números entre parênteses ao lado de cada espécie correspondem ao código de acesso na micoteca do Departamento de Microbiologia da UFC

Para as análises de expressão gênica, foram utilizadas cepas de *C. albicans* (SC5314), cujo genoma foi sequenciado pelo Stanford DNA Sequencing and Technology Center, USA. Além dessa, foram utilizadas as cepas *C. albicans* *dRIM101* e *C. albicans* *dTUP1*, que são cepas com deleção nos genes *RIM101* e *TUP1*. O gene *RIM101* codifica um fator de transcrição envolvido em respostas a pH alcalinos e o gene *TUP1* codifica um repressor do crescimento filamentoso. Todas essas cepas foram adquiridas, mantidas em meio ágar Sabouraud e conservadas no Instituto de Microbiologia Médica da Escola de Medicina da Universidade de Göttingen, Göttingen, Alemanha.

3.3 Kits e Soluções para os Ensaio de Microarranjos de DNA e qPCR

Os kits e soluções utilizadas para o ensaio de microarranjos de oligonucleotídeos estão listados abaixo, de acordo com cada etapa experimental:

1) Isolamento do RNA de células com reagente TRIzol

- Reagente TRIzol® (Invitrogen, Cat. N° 15596026)
- Clorofórmio (Roth, Cat N° 7331.1)
- Álcool isopropílico (Merck, Cat N° 1.09634)
- Etanol (em DEPC água)
- Água livre de RNase/Água MilliQ
- RNaseZAP® (SigmaAldrich, Cat N° R2020)
- GlycoBlue (Ambion, Cat N°AM9516)

2) Marcação do cRNA com cianina 3

- QuickAmp Labeling Kit Cy3 OneColor (Agilent, Cat. N°51900442)
- RNA SpikeIn Kit, onecolor (Agilent, Cat. N° 51885282)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Cat. N° 74104 or 74106)
- 25x Tampão de fragmentação (Agilent, Cat. N° 51855974)
- 20x SSPE (AppliChem, Cat. N° A1397.1000)
- 10x Agente bloqueador (Agilent, Cat. N° 51885281)
- Água livre de RNase/água MilliQ

3) Hibridização na lâmina de microarranjos

- Tampão HI-RPM 2x para hibridização (Agilent, Cat. N° 51900403)
- 2x Tampão de hibridização (Agilent, Cat. N° 51855973)
- 20 % N-Lauroilsarcosina (Sigma, Cat. N° L7414)
- Acetonitrila (AppliChem, Cat. N° A1606.2500)

Os kits e soluções utilizadas para o ensaio de qPCR estão listados abaixo:

- iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Cat N° 1708891)
- água MilliQ
- iQ SYBR Green Supermix (BioRad)

4. MÉTODOS

4.1 Extração e Purificação da SBTX

A purificação de SBTX foi efetuada como descrito no item 4.1 do capítulo 2.

4.2 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras

Ensaio biológico foram realizados no intuito de avaliar qual espécime de levedura seria mais sensível a SBTX. As células foram obtidas da seguinte forma: alíquotas das espécies de *C. albicans*, *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* foram retiradas de placas de Petri, contendo colônias crescidas, e colocadas em novas placas contendo ágar Sabouraud, tendo sido feitas estriações sobre o meio para obtenção de um crescimento celular homogêneo. Esta nova placa foi deixada na estufa a 30 °C, por 48 horas e, em seguida, usada para obtenção das células utilizadas no ensaio. Com auxílio de uma alça, uma alíquota celular foi retirada e adicionada em 100 mL de NaCl 0,15 M, para a quantificação dessas células ser efetuada, usando uma câmara de Neubauer em microscópio óptico ("Olympus system Microscope BX 60").

A avaliação da atividade da SBTX sobre o crescimento celular de leveduras foi feita em meio líquido. Dessa forma, placas (96 poços) de cultura de células contendo 200 µL de meio de cultura para o crescimento celular (ágar Sabouraud) receberam as células de leveduras (1×10^4 células/mL) e amostras de SBTX (125, 250 e 400 µg/mL). O acompanhamento do efeito da SBTX sobre as leveduras testadas foi realizado através da densidade óptica calculada a partir de leituras a 660 nm em leitor de ELISA a cada 6 horas, por um período de 42 horas. Controles foram feitos sem a adição da toxina no meio. Os ensaios foram feitos em triplicata e em condições de assepsia usando capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Análise da morfologia de células de leveduras tratadas com SBTX foi feito pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as células de leveduras, crescidas por 36 horas em ágar Sabouraud na ausência e na presença de SBTX a diferentes concentrações, foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), formaldeído 2% (v/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 30 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Subsequentemente, os materiais foram lavados três vezes com o tampão descrito acima, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1,0% (m/v), diluído no mesmo tampão, por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, lavados com água destilada. Após esse procedimento, as células de levedura foram desidratadas em acetona, secadas no ponto crítico com CO₂, cobertas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 Zeiss através da emissão de elétrons secundários. Células também crescidas na ausência de SBTX foram analisadas (controle) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

4.4 Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras

Este ensaio foi baseado na permeabilização de membranas de leveduras crescidas em presença de SBTX, avaliada através do corante “SYTOX Green”, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999). “SYTOX Green” é um corante fluorescente com alta afinidade para DNA, penetrando em células com a membrana plasmática comprometida. Assim, ao final do ensaio de crescimento, conforme descrito anteriormente, uma alíquota contendo 2×10^6 células/mL foi incubada com “SYTOX Green” a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após 30 minutos de incubação com o corante, o material a ser analisado foi colocado sobre lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina e analisado em microscópio óptico de fluorescência.

4.5 Ensaio de Acidificação do Meio Estimulado por Glicose

Este ensaio foi realizado para avaliar se a SBTX teria influência sobre a capacidade das células de *S. cerevisiae* no transporte de prótons intracelular para o meio externo. O ensaio foi realizado através da medição do pH do meio de

cultura como descrito anteriormente por Monk e Perlin (1994). As células de *S. cerevisiae* foram cultivadas em caldo Sabouraud por 16 horas a 30 °C. As células foram colhidas por centrifugação a 3.000 x g, 4 °C, 5 minutos, lavadas três vezes com Tris-HCl 0,005 M, pH 6,0, e o precipitado foi ressuspensão em tampão Tris para uma densidade celular de $1,0 \times 10^7$ células/mL. SBTX (4 mL de 400 µg/mL) foi adicionada a 50 µL da suspensão de células e incubadas em banho de gelo durante 30 minutos com agitação suave. Após a incubação, uma solução de glucose 0,5 M foi adicionada para uma concentração final de 0,15 M e o pH do meio externo monitorado por 60 minutos. Experimentos controle (BSA a 800 µg/mL, em vez de SBTX ou Tris-HCl 0,005 M, pH 6,0) foram realizados em paralelo para medir o grau de acidificação do meio externo, na ausência de SBTX. A variação na concentração de prótons (H^+) foi calculada com base na diferença de pH de 0 e 60 minutos.

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para verificar a ocorrência de alterações estruturais nas células de leveduras tratadas com SBTX, foi feita microscopia eletrônica de transmissão. Células de leveduras, crescidas por 36 horas em Sabouraud na ausência e na presença de SBTX a diferentes concentrações, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (v/v) e paraformaldeído 4% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, os materiais foram lavados, pós-fixados em 1% (m/v) de tetróxido de ósmio diluído no tampão acima, por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, v/v) e embebidas em resina Epon (Polybeded). Cortes ultrafinos foram feitos utilizando um ultramicrotomo, colocados sobre grades de níquel, corados com acetato de uranila 1 % por 10 minutos e citrato de chumbo 5 % por 5 minutos e, então, observados no microscópio de transmissão Zeiss 900 operando a 80 kV (REYNOLDS, 1963).

4.7 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de *Candida albicans* SC5314

Células de *C. albicans* SC5314 foram utilizadas como modelo biológico para avaliar se SBTX seria capaz de causar alteração no padrão de expressão gênico, uma vez que *C. albicans* SC5314 possui tanto o genoma completo disponível (<http://www.candidagenome.org>, <http://www.yeastgenome.org/>), bem como os produtos de seus genes anotados (GARAIZAR *et al.*, 2006). Sendo assim, a primeira etapa foi avaliar o desempenho de *C. albicans* SC5314 na presença da toxina. Para obtenção das células da levedura, alíquotas da espécie *C. albicans* SC5314 foram retiradas de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro), contendo colônias crescidas em meio ágar Sabouraud e colocadas em nova placa contendo este mesmo meio de cultura, sendo feitas estriações para obtenção de um crescimento celular homogêneo. Esta nova placa foi deixada na estufa a 30 °C, por 24 horas e, em seguida, usada para obtenção das células utilizadas no ensaio. Com o auxílio de uma alça, uma alíquota celular foi retirada e adicionada em 10 mL de NaCl 0,15 M, a fim da quantificação dessas células ser efetuada, usando uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (“Olympus System Microscope BX 60”).

A avaliação da atividade da SBTX sobre o crescimento celular de leveduras foi feita em meio líquido. Dessa forma, placas (96 poços) de cultura de células, contendo SBTX diluída em 100 µL de meio de cultura para o crescimento celular (Sabouraud) a diferentes concentrações, receberam 100 µL de células de leveduras (1×10^4 células/mL). A placa foi, então, incubada em um leitor de ELISA com temperatura constante de 30 °C e o acompanhamento do efeito da SBTX sobre as leveduras testadas realizado através da densidade óptica calculada a partir de leituras a 630 nm a cada 15 minutos, por um período de 40 horas. Controles foram feitos sem a adição da toxina no meio. Os ensaios foram feitos em triplicata e em condições de assepsia usando capela de fluxo laminar, segundo metodologia descrita pelo Subcomitê Europeu para Testes de Susceptibilidade Antifúngica (ASFT) (doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x).

4.8 Análise do Padrão de Expressão Gênica de Células de *C. albicans* SC5314 Incubadas com a SBTX Através da Técnica de Microarranjos de DNA

O experimento de microarranjos de DNA foi realizado em parceria com o Departamento de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Georg August, Göttingen, Alemanha.

Para a análise do padrão de expressão gênica de *C. albicans* SC5314 incubada com a SBTX através da técnica de microarranjos de DNA, foram realizados dois experimentos que avaliaram o efeito da toxina sob essas células, como descrito no item anterior. Esses experimentos foram realizados de forma independente e sob as mesmas condições. Sendo assim, foi adquirida uma lâmina de microarranjos de oligonucleotídeos "Candida Project Custom" (Agilent Arrays Technologies) no formato 8 × 15 k. Cada arranjo continha 6.106 sequencias de oligonucleotídeos de 70 bases, sendo que 5.818 correspondia a ORFs ("Open Reading Frames") preditas de *C. albicans* SC5314 depositadas no "Candida Genome Database" e 288 a regiões utilizadas no processo de normalização dos dados.

4.8.1 Extração do RNA Total de Células de *C. albicans* SC5314 Tratadas com SBTX

Após 18 e 20 horas de incubação de *C. albicans* SC5314 com SBTX, período no qual a levedura encontrava-se em crescimento exponencial, foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio de cultura em tubo Eppendorf e centrifugada a 5000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao "pellet" celular adicionado 1 mL do reagente TRIzol, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de dissociação, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. Decorrida a centrifugação, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,5 mL de álcool isopropílico e adicionado 1 µL de glycoblue 1%. As amostras foram deixadas a -20 °C, overnight e, no dia seguinte, centrifugadas a 12.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C, e lavadas com 1 mL de etanol 75%. Outra centrifugação foi realizada sob as mesmas condições descritas. O sobrenadante foi removido e o "pellet" secado a 37 °C. O RNA foi dissolvido em 100 µL de água livre de RNase, sendo sua integridade e qualidade analisada por um Bioanalyzer 2100 (Agilent

Technologies). A quantificação foi realizada utilizando em Nano Drop (Agilent Technologies).

4.8.2 Marcação do cRNA

Amostras de RNA foram convertidas em cRNA e marcadas utilizando cianina3, em duas etapas. A primeira etapa consistiu da síntese da primeira e segunda fita de cDNA. Para isso, um volume referente a 200 ng do RNA total foi adicionado a um tubo livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 1,2 µL do primer T7 e um volume apropriado da solução Spike-In (Agilent), encerrando um volume final de 11,5 µL. O primer foi desnaturado a 65 °C, por 10 minutos, em termociclador. A reação foi encerrada pela incubação da amostra em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 8,5 µL de cDNA master mix, procedida de incubação em termociclador a 40 °C, por duas horas, e depois por 65 °C, por 15 minutos. A reação foi encerrada pela incubação da amostra em gelo por 5 minutos, sendo, então, prosseguida a segunda etapa. Essa consistiu da síntese, amplificação e marcação de cRNA. Para isso, foram adicionados 600 µL de "transcription master mix". O RNeasy mini kit (Qiagen) foi utilizado para purificar as amostras de cRNA amplificado (PAPOUTSI *et al.*, 2007). A quantificação do cRNA foi feita em Nano Drop. A Figura 1 ilustra o esquema de amplificação e marcação do cRNA utilizado.

4.8.3 Hibridização do cRNA nas Lâminas de "Arrays"

A 1,5 µL do cRNA marcado por cianina3 foram adicionados 25 µL de tampão de hibridização (Agilent) e 25 µL de tampão de hibridização HI-RPM (Agilent). A hibridização foi feita em atmosfera livre de ozônio. Em uma câmara de incubação, a solução de hibridização foi posta em contato com a lâmina de Array e deixada a 65 °C por 17 horas. Em seguida, foi feita a lavagem da lâmina de Arrays com uma solução 6 vezes concentrada de fosfato de sódio 0,2 M contendo NaCl 3 M, EDTA 0,020 M e *N*- lauroilsarcosina 0,005%. A lâmina foi secada em acetronitrila 100% e analisada pelo Agilent DNA microarray scanner.

Amplificação do cRNA

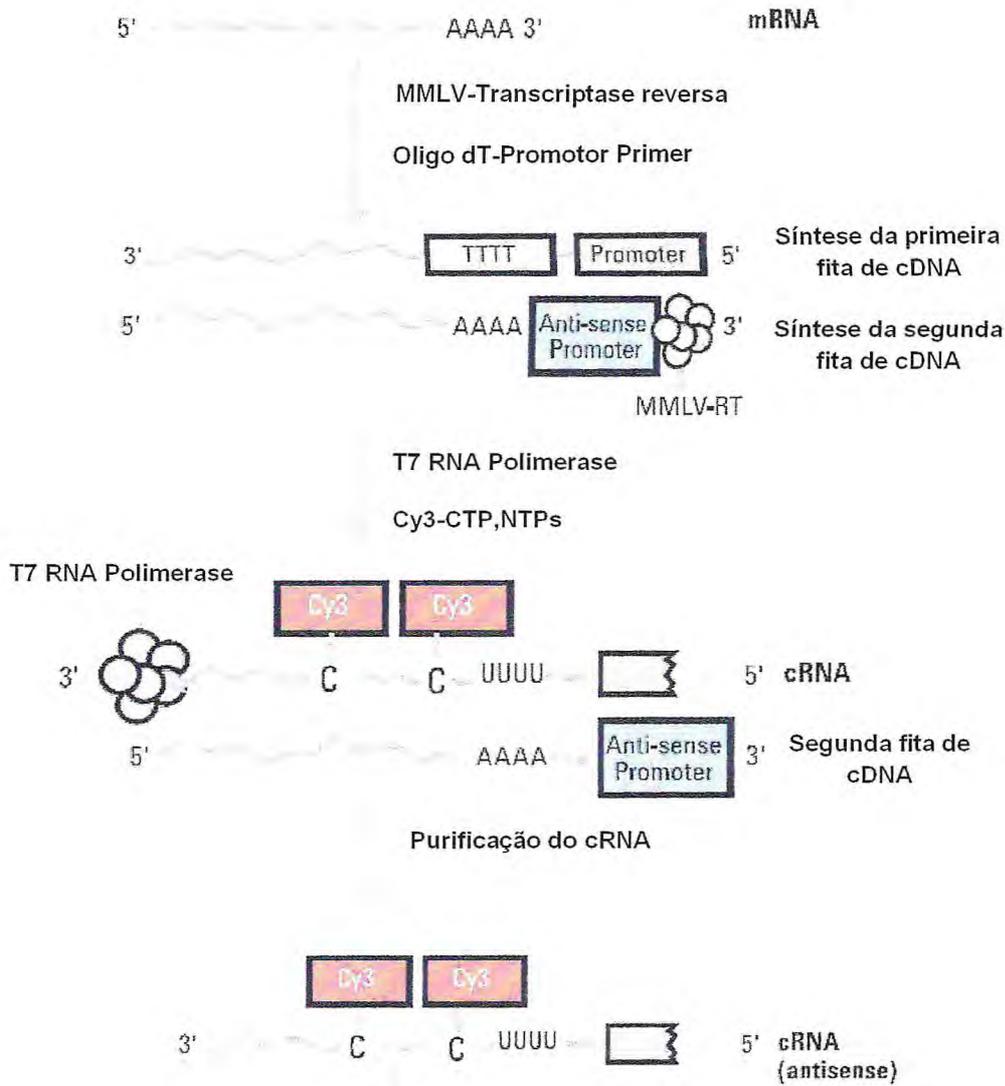


FIGURA 01 - Esquema de amplificação e marcação de cRNA.

4.8.4 Extração, Normalização e Análise dos Dados

A extração dos dados foi feita pelo Software Microarray-Images Feature Extraction 10.5.1, seguida de normalização pelo Software Limma, utilizando o algoritmo de LOWESS (YANG *et al.*, 2002). Os dados normalizados foram visualizados em um gráfico do tipo M x A, onde:

$$M = \text{Log}_2\text{Toxina} - \text{Log}_2\text{Controle}$$

$$A = \frac{1}{2} \times (\text{Log}_2\text{Toxina} + \text{Log}_2\text{Controle})$$

Os resultados representam uma média de valores de dois experimentos e somente os genes diferencialmente expressos em *C. albicans* SC5314 incubada com SBTX em relação ao controle, cujos valores de Fold Change (FC) em escala Log_2 foram maiores que 0,69 foram considerados e analisados.

4.8.5 Validação dos Genes por Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-qPCR)

Para validar o experimento de microarranjos de DNA, foram selecionados quatro genes, de modo a quantificar seus níveis de expressão pela técnica de PCR quantitativo, que é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA ciclo a ciclo. Sendo assim, o número de cópias dos genes *RIM101*, *TUP1*, *AOX2* e *HGT1* foi determinado utilizando iQ SYBR Green Supermix kit (BioRad), um corante fluorescente intercalante de DNA, que é captado pelo termociclador iQ 5 Cyclor (BioRad) a cada novo ciclo da reação de PCR, permitindo que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra. O volume total da reação de 25 μL foi composto de 12,5 μL de iQ SYBR Green Supermix, 0,4 μL de iniciador senso, 0,4 μL de iniciador reverso, 10,7 μL de água ultrapura (grau Milli-Q) e 1 μL de cDNA.

O protocolo de amplificação consistiu de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 60°C ou 55°C e extensão a 72°C por 30 segundos. Os iniciadores utilizados estão listados na Tabela 01. Todas as reações foram realizadas em termociclador iQ 5 Cyclor (BioRad). A análise da amplificação gênica realizada pela qPCR foi feita utilizando a quantificação

TABELA 01 - Sequências de oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados para (RT- qPCR)

Gene	RefSeq	ORF	Sequência de oligonucleotídeos
RIM 101	XM_709954.1	orf19.7274	S: 5'-AAGCGAGCAAACCTCGATGAA- 3' R:5'- GTGGAGCTTGTGCCATTTGT-3'
AOX2	XM_718366.1	orf19.4773	S: 5'- TGTTGGTCAAGGGGTTTTCA -3' R: 5'- TGCCACTTCAGGGATTTTCA -3'
TUP1	XM_713975.1	orf19.6109	S: 5'- GTACAACCCAGCGTTCTCCA -3' R: 5'- CAACTCTCCGGTGGTGACAT -3'
HGT1	XM_707859.1	orf19.4527	S: 5'- GGGCCACATTAATGGTGTG -3' R: 5'- CGATCACCATGAGCTTGGAT -3'
18S rRNA (gene de referência)	NW_139715.1	-	S: 5'- GACACGGGGAGGTAGTGACA-3' R: 5'- GGGTCCAGTACGCATCAAAA-3'

relativa, na qual foi avaliada a relação do Ct “Threshold cycle” obtido na amostra contendo a toxina em relação ao Ct de células de *C. albicans* SC5314 incubadas na ausência da toxina. O Ct é o primeiro ciclo de amplificação, no qual o “amplicon” de DNA é detectado acima da linha basal (FIGURA 02). Sendo assim, a partir dos valores de Ct encontrados, foi calculado o valor do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, 2001), em que:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1 + E)^{-\Delta Ct \text{ do gene teste}}}{(1 + E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

Com E = eficiência da reação de PCR

ΔCt do gene teste = diferença entre o valor de Ct da amostra teste e de Ct de um gene de referência.

ΔCt do gene controle = diferença entre o valor de Ct da amostra controle e de Ct de um gene de referência.

O cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ somente pode ser utilizado se as eficiências de amplificação do gene teste e do gene controle apresentarem valores muito próximos. A partir dos valores do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi calculado o FC (Fold Change) e expresso em escala Log_2 , para uma comparação com os resultados obtidos no microarranjos de DNA.

4.9 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de *C. albicans dTUP1* e *C. albicans dRIM101*

Para avaliar se as deleções dos genes *RIM101* e *TUP1*, que codificam um fator de transcrição para resposta a pH alcalino e um repressor de crescimento filamentosos, respectivamente, aumentam ou reduzem a sensibilidade dessas leveduras a SBTX, células de *C. albicans dTUP1* e *C. albicans dRIM101* foram incubadas com a toxina seguindo o protocolo descrito no item 4.2.

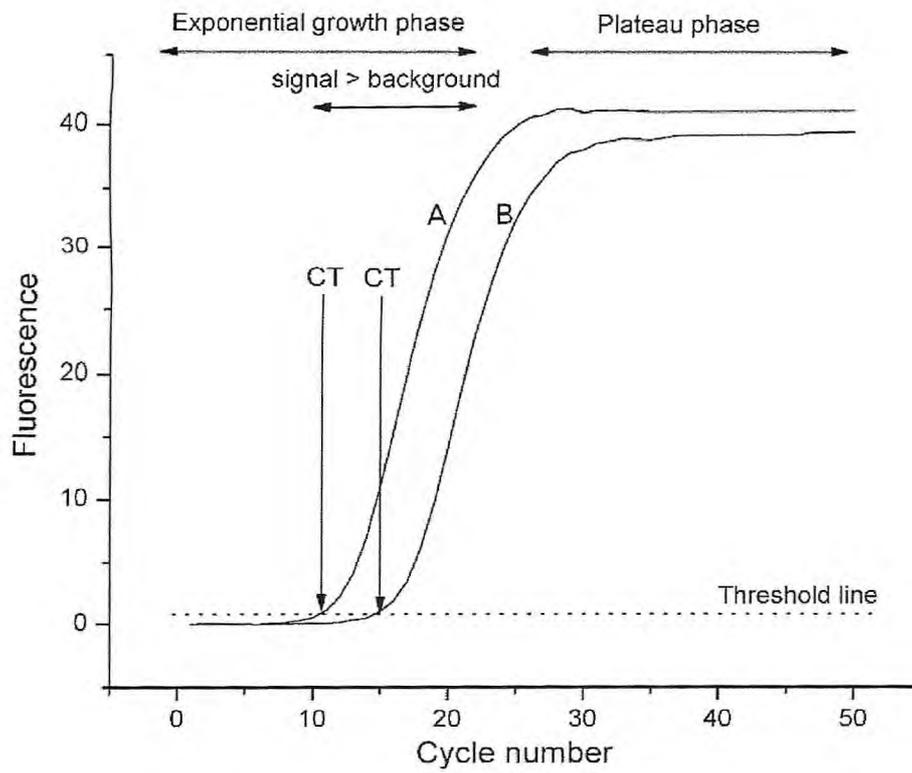


FIGURA 02 - Gráfico de amplificação em um experimento de qPCR evidenciando o CT "Threshold cycle".

5. RESULTADOS

5.1 Extração e Purificação da SBTX

SBTX pura mostrou o mesmo perfil apresentado na Figura 01 do Capítulo 2.

5.2 Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de Leveduras

SBTX foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* nas concentrações de 125, 250 e 400 µgP/mL (FIGURA 03A), quando comparada ao controle, que consistiu de Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. Todavia, em ensaios utilizando as mesmas concentrações, essa toxina não foi capaz de inibir o crescimento de *P. membranifaciens* (FIGURA 03B) e *C. parapsilosis* (FIGURA 03C).

5.3 Análise da Morfologia das Células de Leveduras Tratadas com SBTX por Microscopia Eletrônica de Varredura

Apesar de ter sido verificada inibição do crescimento de *C. albicans*, não foram visualizadas alterações morfológicas nas células, após adição de SBTX 400 µgP/mL (FIGURA 04B). Entretanto, foi observada formação de pseudohifas nas células de *P. membranifaciens* (FIGURA 04D) e de *C. parapsilosis* (FIGURA 04F) tratadas com SBTX 400 µgP/mL, conforme mostram as fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura.

5.4 Avaliação do Efeito da SBTX Sobre a Permeabilidade de Membranas de Leveduras

SBTX (400 µg/mL) foi capaz de causar permeabilização de membrana nas células de *C. parapsilosis* (FIGURA 05C), *P. membranifaciens* (FIGURA 06C) e *C. albicans* (FIGURA 07C), demonstrada pela penetração do corante fluorescente "SYTOX Green".

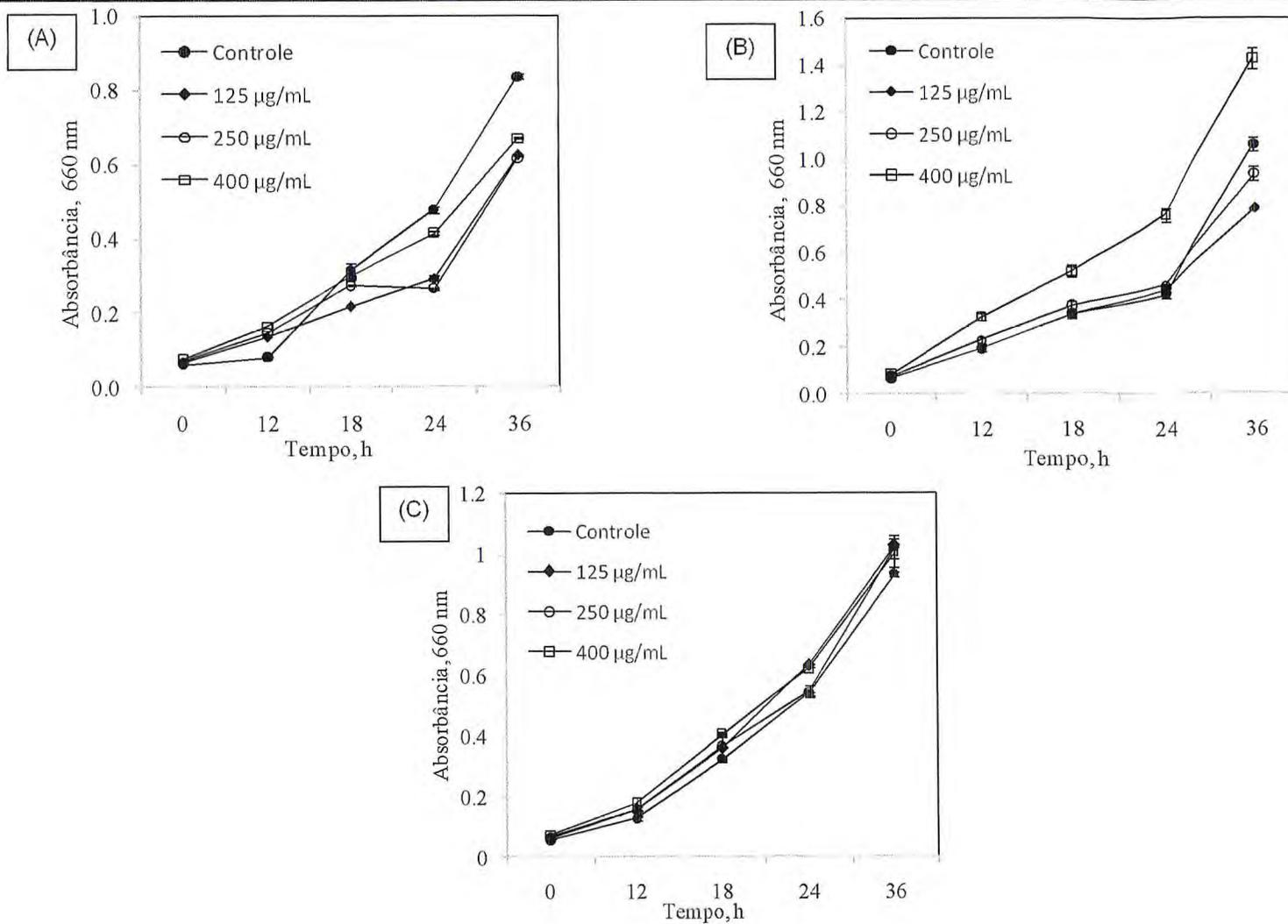


FIGURA 03 – Desenvolvimento de células de *C. albicans* (A), *P. membranifaciens* (B) e *C. parapsilosis* (C) em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”) na presença de SBTX em diferentes concentrações.

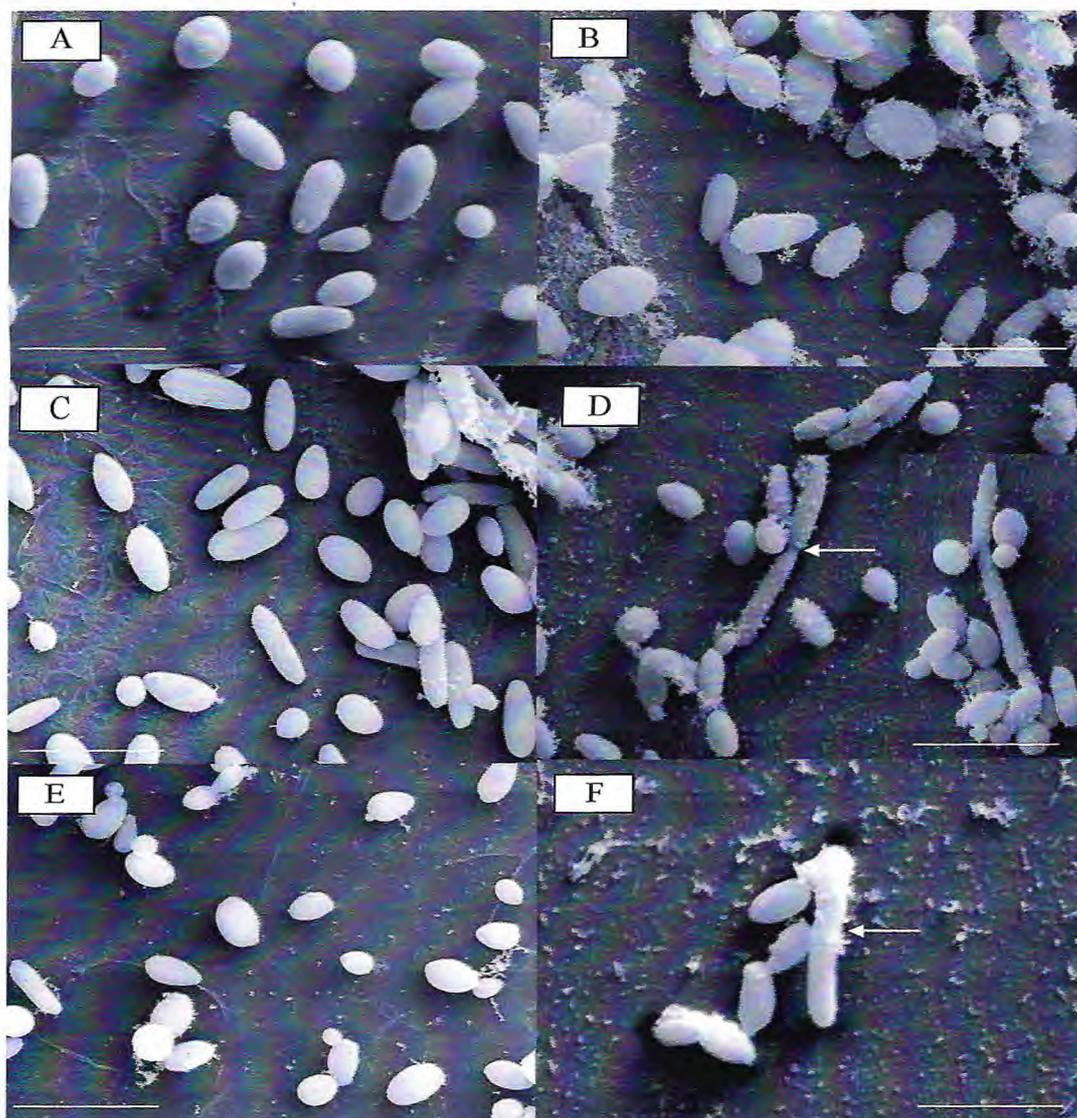


FIGURA 04 - Microscopia de varredura de células de leveduras na presença de SBTX. (A, C, E) Controle, ausência de SBTX; (B,D,F) presença de SBTX (400 µg/mL). (A, B) *C. albicans*; (C, D) *P. membranifaciens*, (E, F) *C. parapsilosis*. Barras: 20 µm.

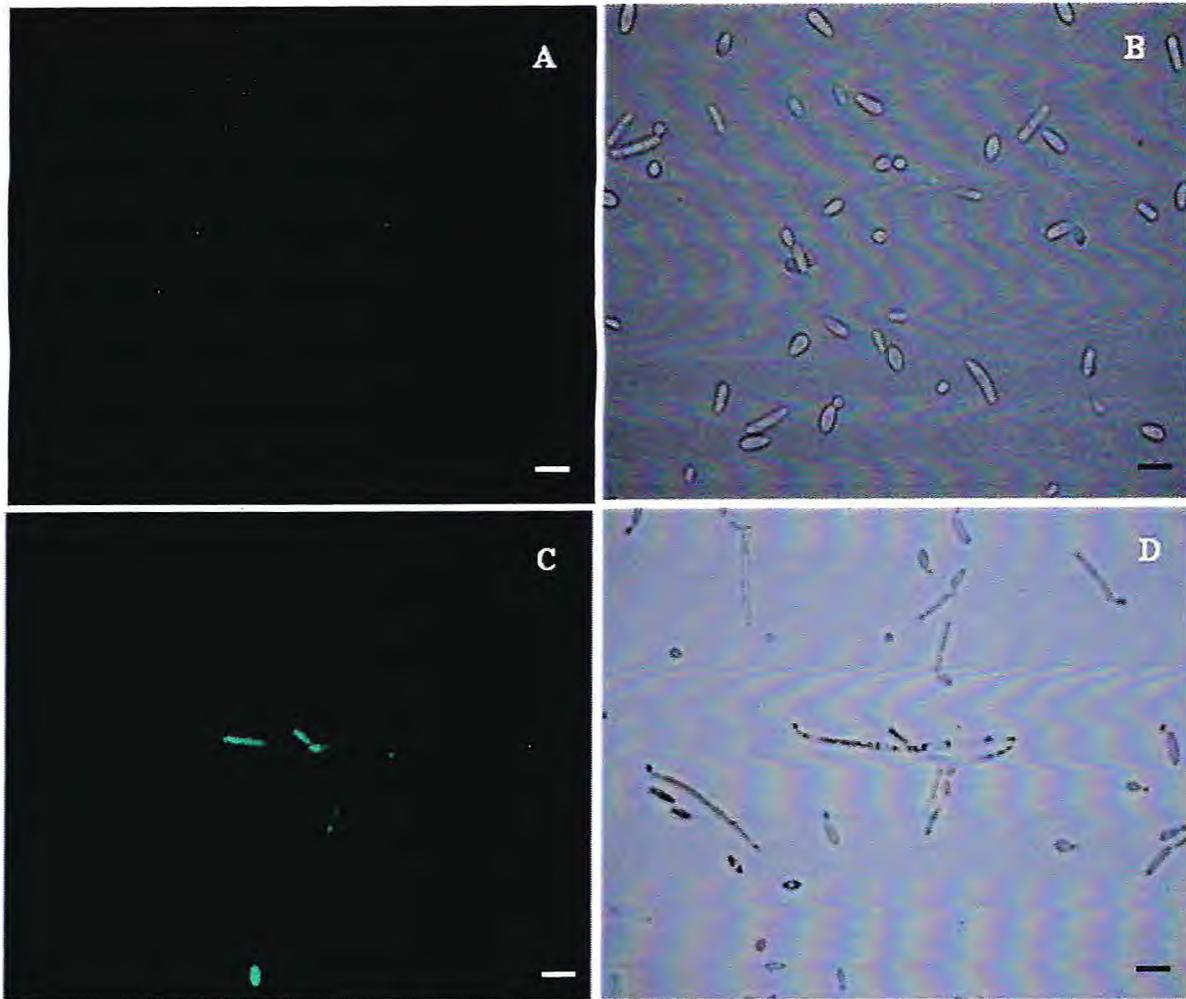


FIGURA 05 - Células da levedura *C. parapsilosis* visualizadas em microscopia de fluorescência (A, C) após tratamento com “SYTOX Green” e em microscopia óptica (B, D). (A, B) – *C. parapsilosis* controle (sem adição de SBTX) e (C, D) – *C. parapsilosis* na presença de SBTX (400 µg/mL). Barras: 10 µm.

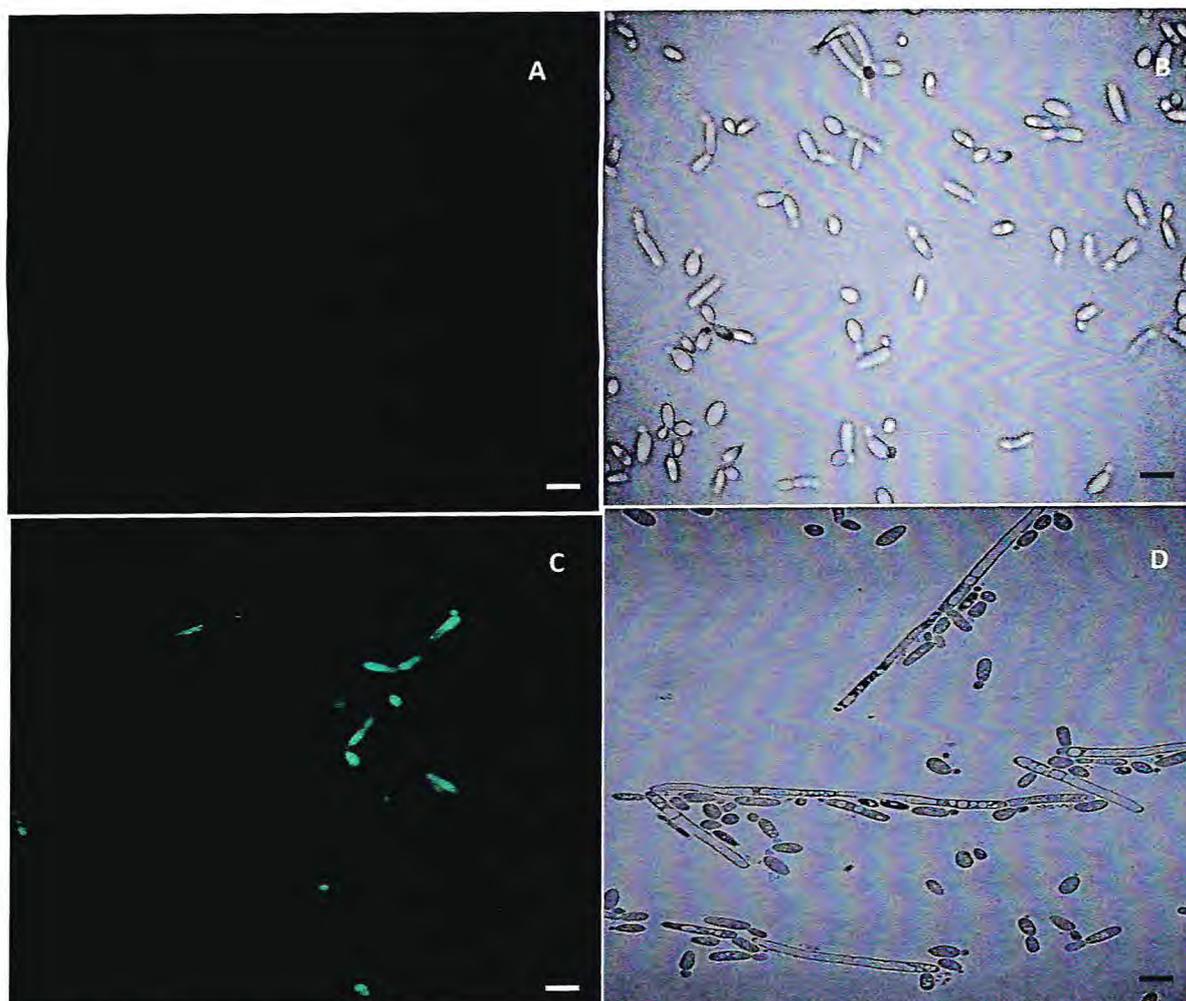


FIGURA 06 - Células da levedura *P. membranifaciens* visualizadas em microscopia de fluorescência (A, C) após tratamento com “SYTOX Green” e em microscopia óptica (B, D). (A, B) – *P. membranifaciens* controle (sem adição de SBTX) e (C, D) – *P. membranifaciens* na presença de SBTX (400 µg/mL). Barras: 10 µm.

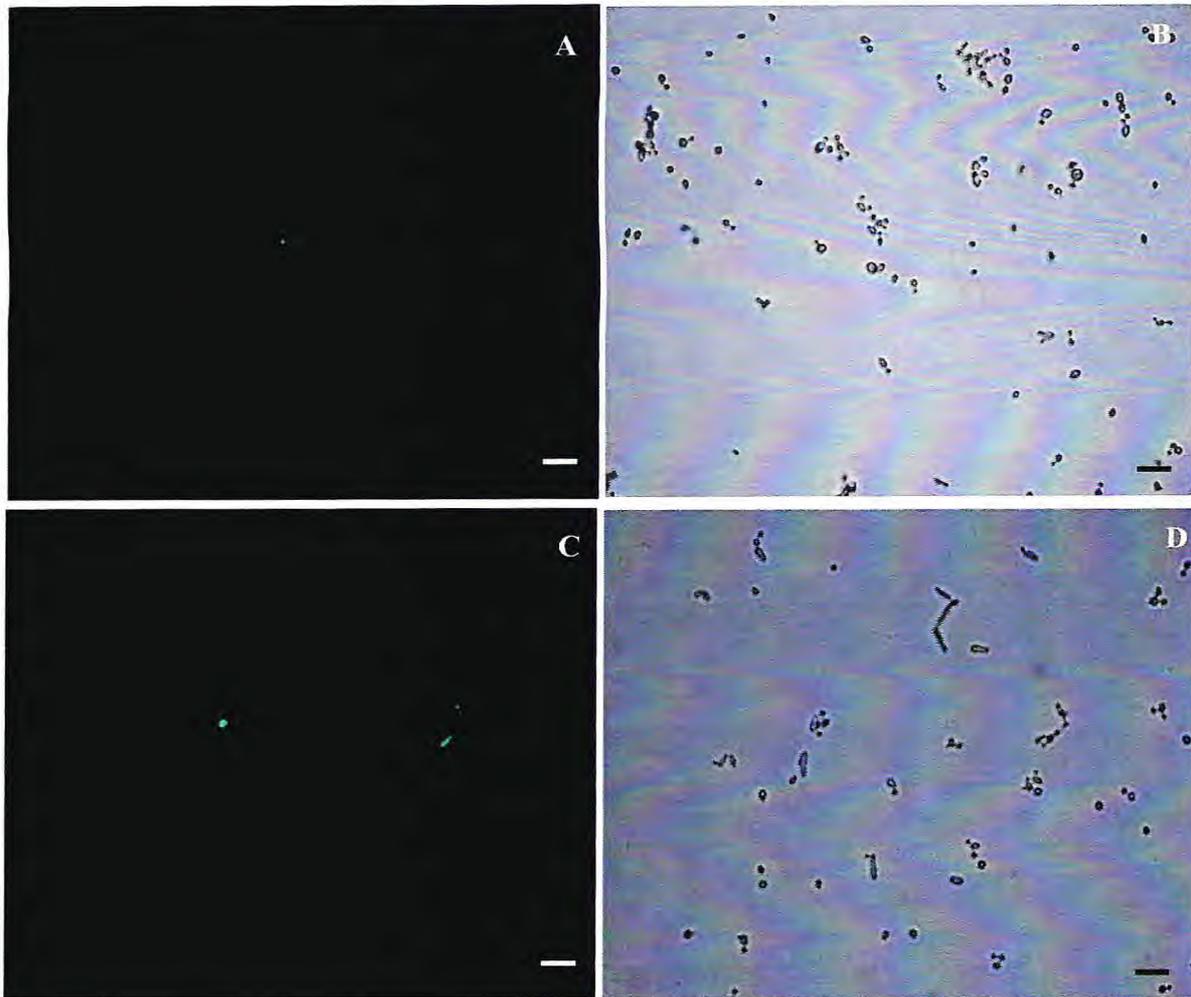


FIGURA 07 - Células da levedura *C. albicans* visualizadas em microscopia de fluorescência (A, C) após tratamento com “SYTOX Green” e em microscopia óptica (B, D). (A, B) – *C. albicans* controle (sem adição de SBTX) e (C, D) – *C. albicans* na presença de SBTX (400 µg/mL).

5.5 Acidificação do Meio Estimulada por Glicose

A presença de SBTX (400 µg/mL) no meio de cultura inibiu a acidificação do meio externo, estimulada por glicose em células *S. cerevisiae*, em 27% (FIGURA 08), quando comparada aos controles.

5.6 Análise de Alterações Estruturais em Células de Leveduras Tratadas com SBTX por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Como mostrado na Figura 09, SBTX (400 µg/mL) causou alterações drásticas na parede (FIGURA 09C) e no citosol (FIGURA 09D) de células de *P. membranifaciens*, quando comparada ao controle (FIGURAS 09A e 09B). A parede celular apresentou-se descontínua e ocorreu perda da estrutura do citosol, bem como de seu conteúdo, além de aumento de vacuolização. Já em relação às células de *C. albicans*, nenhuma mudança na ultra-estrutura foi verificada, mesmo quando essas células foram tratadas com SBTX na concentração de 400 µg/mL (FIGURA 9E).

5.7 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de *C. albicans* SC5314

Assim como observado anteriormente, SBTX foi também capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* SC5314 já nas concentrações de 100 µg/mL, quando comparada com o controle, que consistiu de Tris-HCl 0,025 M pH 7,5 (Figura 10). Entretanto, o efeito inibitório foi mais pronunciado na concentração de 200 µg/mL, sendo essa concentração selecionada para as próximas etapas.

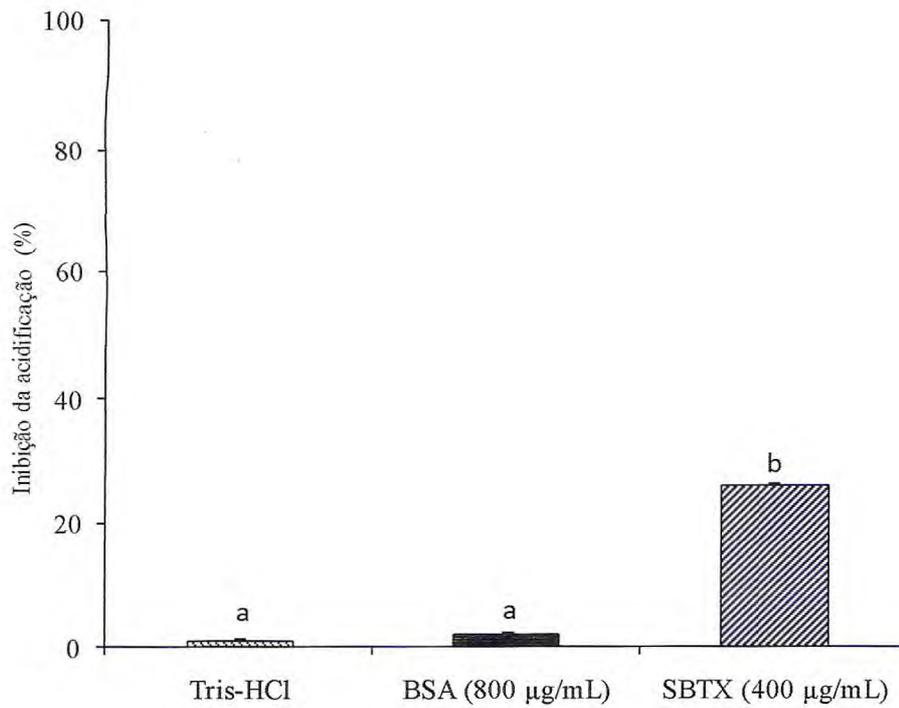


FIGURA 08 - Teste de inibição da acidificação em meio líquido (YPD - “yeast potato dextrose”) estimulado por glicose em levedura *S. cerevisiae* por SBTX. Letras diferentes representam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

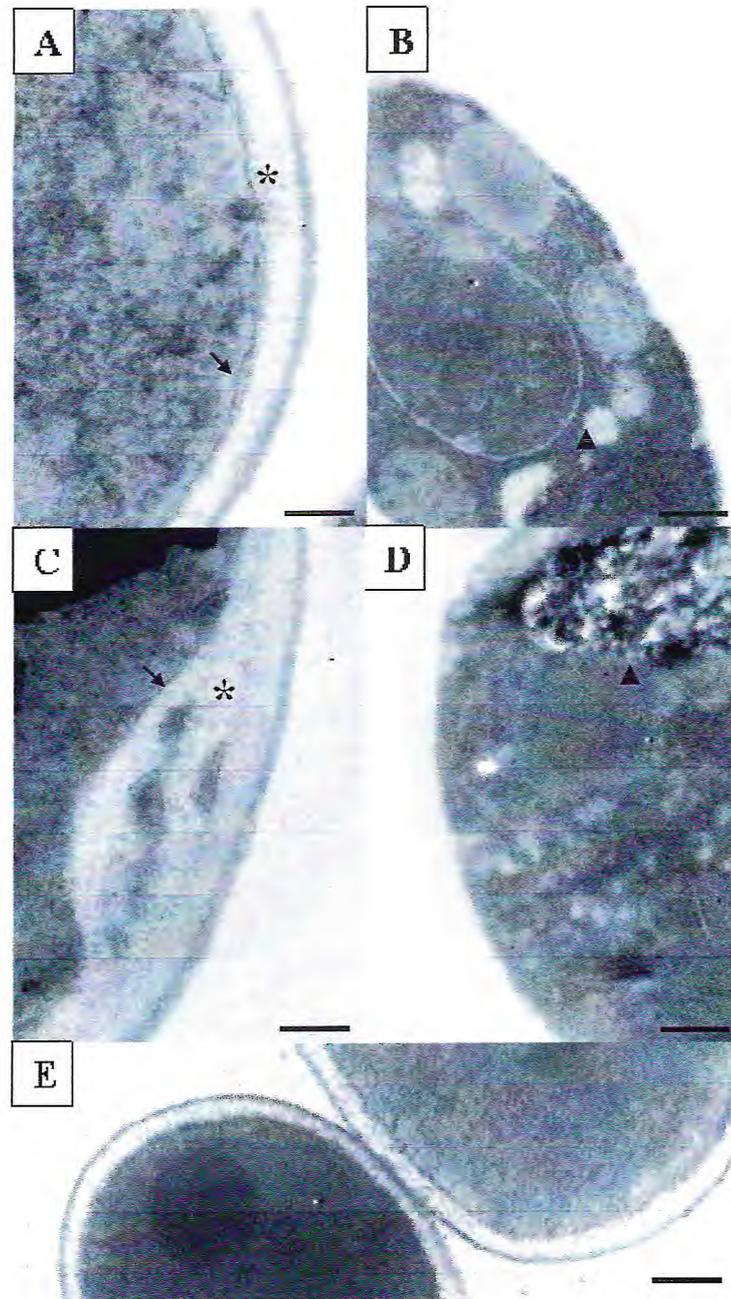


FIGURA 09 - Microscopia eletrônica de transmissão de células de *P. membranifaciens* (A, B, C, D) e *C. albicans* (E) cultivadas na ausência (A, B) e na presença (C, D, E) da SBTX (400 µg/mL). Estrelas indicam ruptura da parede celular; setas pequenas denotam membrana plasmática e setas maiores condensação do citosol com perda da estrutura e extravasamento do conteúdo, além de vacuolização. Barras: (A-C) 0.2 µm; (B-D) 0.4 µm.

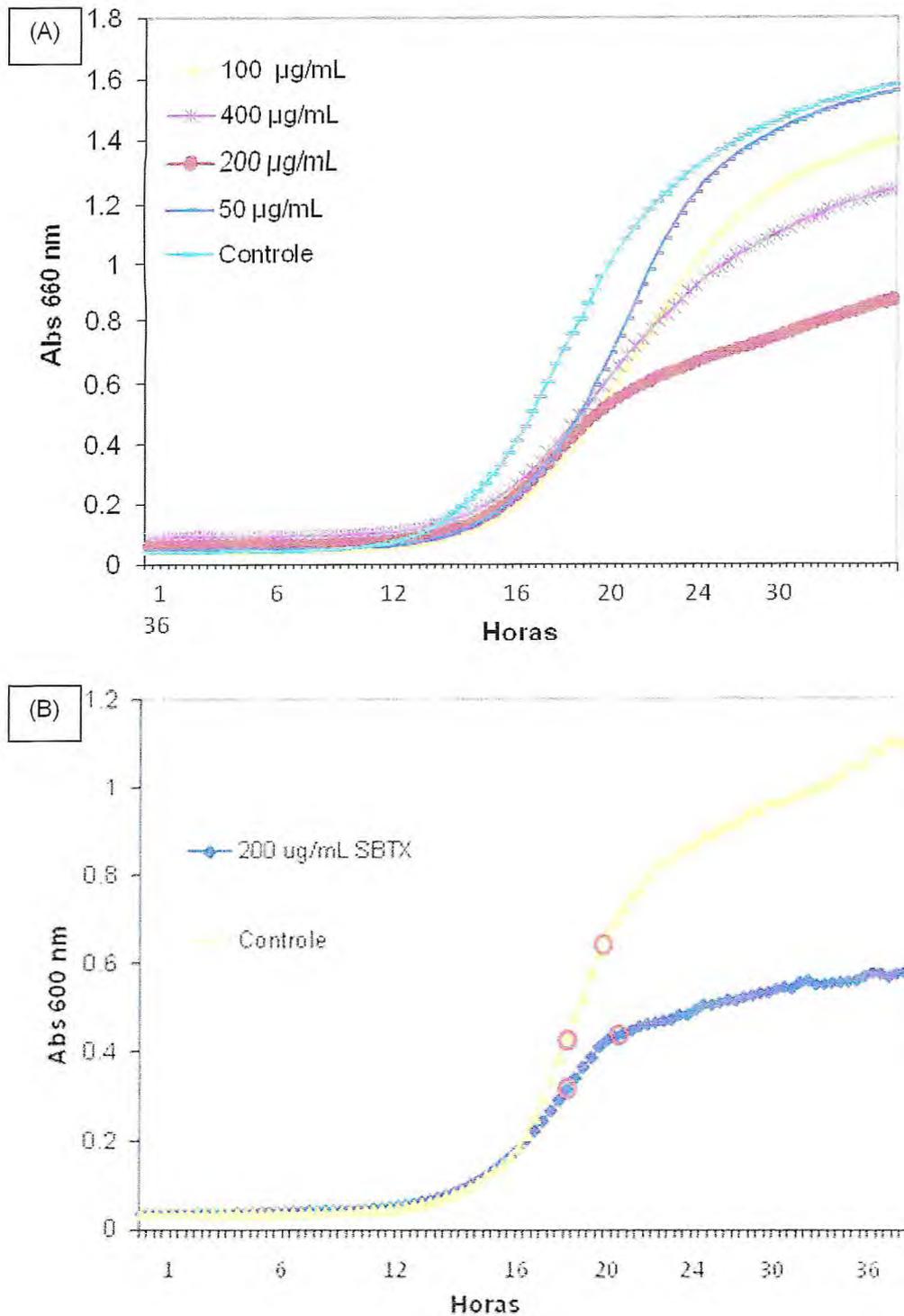


FIGURA 10 - Curvas de crescimento de *C. albicans* SC5314 em meio líquido (Sabouraud) na presença de SBTX em diferentes concentrações (A) e na presença de SBTX a 200 µg/mL (B).

5.8 Análise do Padrão de Expressão Gênica de Células de *C. albicans* SC5314 Incubadas com a Toxina da Soja Através da Técnica de Microarranjos de DNA

Como mostrado na Figura 10B, SBTX na concentração de 200 µg/mL inibiu o crescimento de *C. albicans* SC5314. Esse ensaio foi, então, realizado novamente, sob as mesmas condições, e após 18 e 20 horas de incubação com SBTX, foram retiradas alíquotas das células para posteriores análises.

5.8.1 Avaliação do RNA total de Células de *C. albicans* SC5314 Tratadas com SBTX

A análise de RNA total extraído de células de *C. albicans* SC5314 incubadas com a SBTX por 18 e 20 horas revelou as bandas referentes ao RNA ribossômico 28S e 18S e não mostrou contaminação por RNA ribossômico de bactérias (FIGURA 11).

5.8.2 Marcação e Hibridização do cRNA nas Lâminas de "Arrays"

As concentrações de cRNA marcado nas amostras variaram de 689,93 a 791,40 ng/µL. Sendo essas concentrações suficientes o bastante para prosseguir com a hibridização.

5.8.3 Extração, Normalização e Análise dos Dados

A Figura 12 revela a lâmina de microarranjos após hibridização e varredura em scanner e a Figura 13 mostra a normalização dos dados plotada em gráfico M x A. As figuras 13 e 14 mostram uma visão geral da categorização funcional de ORFs de *C. albicans* SC5314 que foram induzidos por SBTX com base no banco de dados www.candidagenoma.org quando *C. albicans* SC5314 foi incubada com SBTX por 18 e 20 horas. Os resultados representam a média de dois experimentos cujos valores de Fold Change em Log₂ maiores que 0,67 foram considerados. A Tabela 02 mostra uma comparação da categorização funcional dos genes induzidos em *C. albicans* por SBTX tanto em 18 como em 20 horas

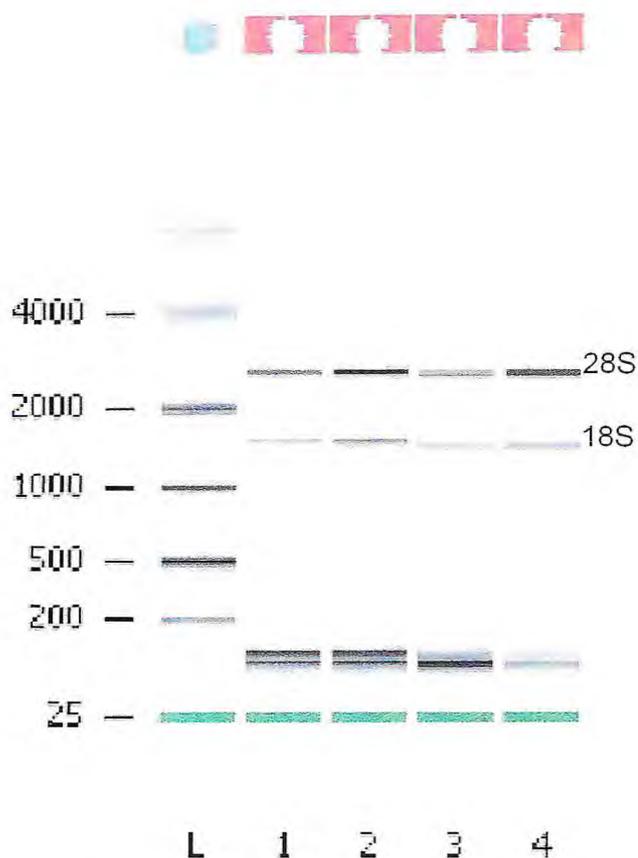


FIGURA 11 - Amostras de RNA total de *C. albicans* SC5314. Imagem reconstruída de gel digitalizado a partir de um Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano LabChip. L - Marcadores; 1 e 3 - *C. albicans* SC5314 na presença de SBTX por 18 e 20 horas, respectivamente; 2 e 4 - *C. albicans* SC5314 na ausência de SBTX por 18 e 20 horas, respectivamente.

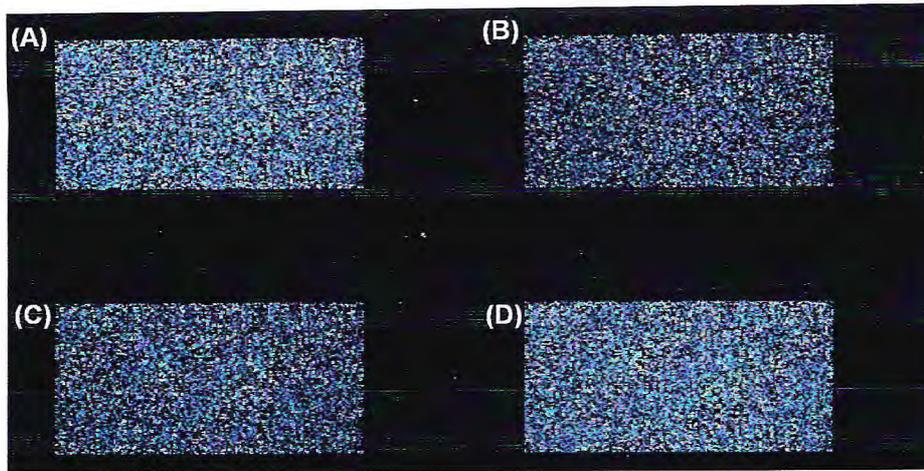


FIGURA 12 - Imagem da hibridização da lâmina de microarranjo de DNA, após varredura por Scanner. Amostras de cRNA foram marcadas com cianina3, sendo provenientes de células de *C. albicans* SC5314 incubadas na presença de SBTX por 18 (A) e 20 horas (B) e na ausência da toxina por 18 (C) e 20 horas (D).

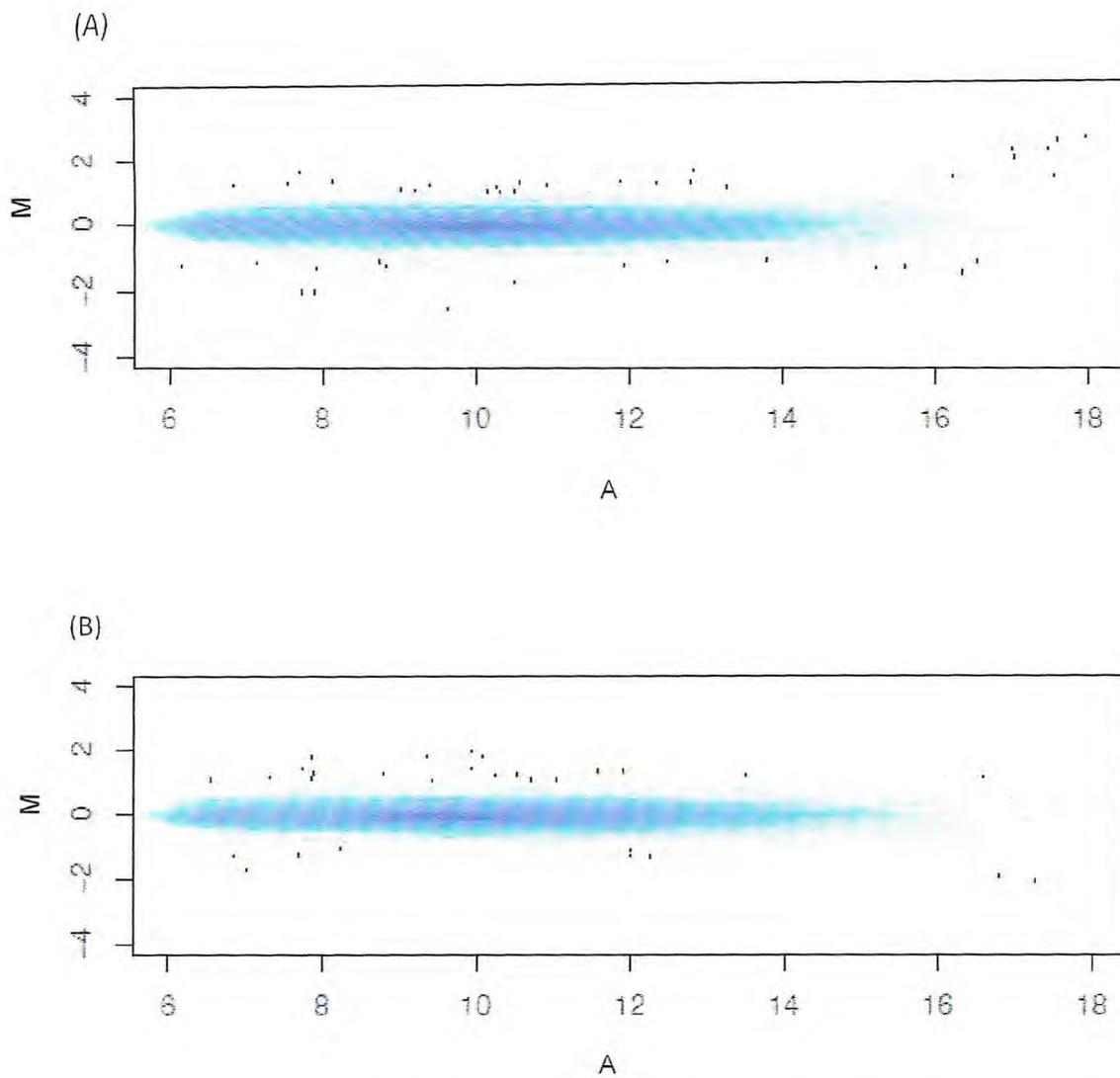


FIGURA 13 - Gráficos M x A representando a normalização dos dados pelo algoritmo de LOWESS. Os gráficos apontam a intensidade do sinal no eixo x (A) e a razão da expressão no eixo y (M), em escala logarítmica. *C. albicans* SC5314 incubada com SBTX por 18 (A) e 20 horas (B).

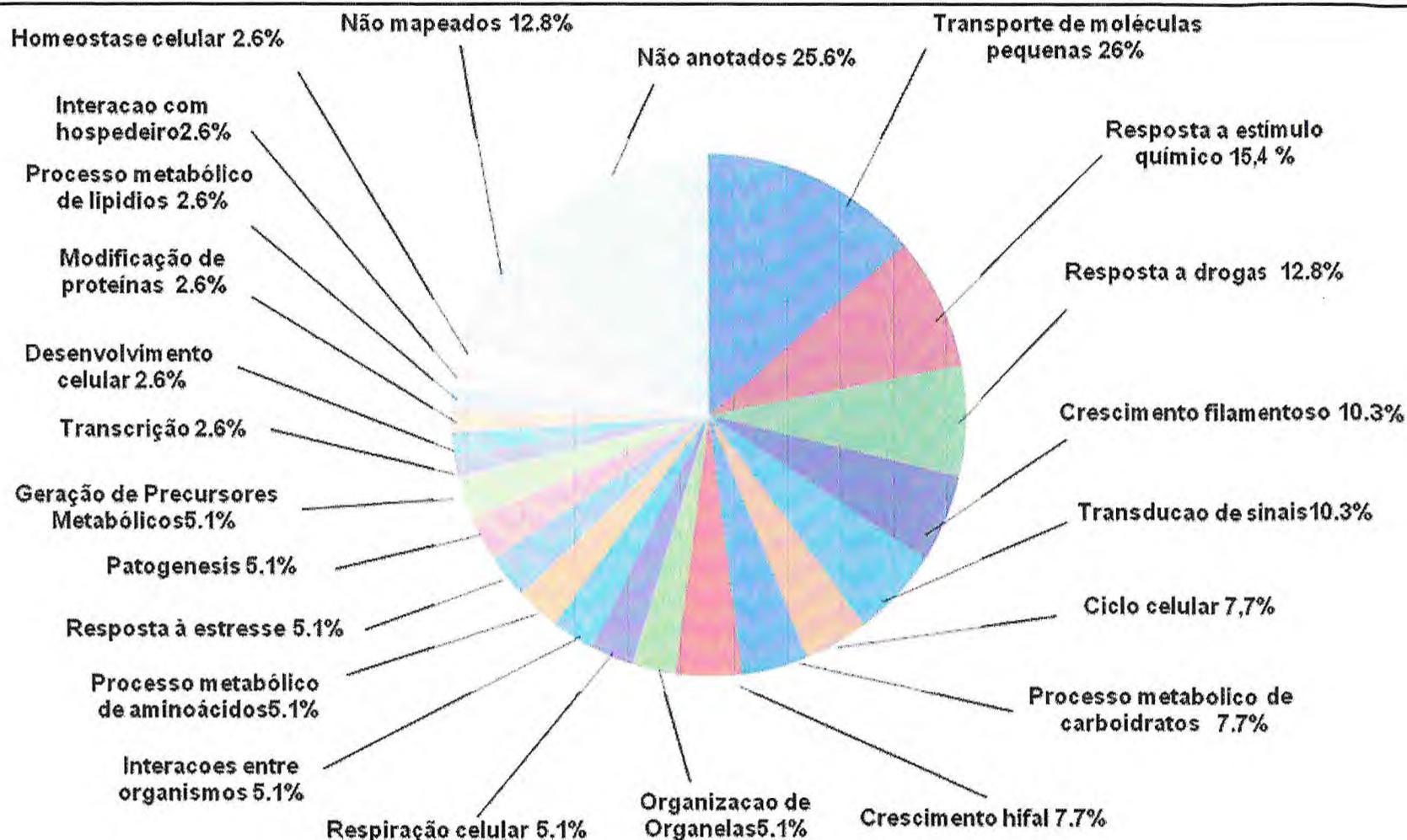


FIGURA 14 - Categorização funcional das ORF's ("Open Reading Frames") imobilizadas nas lâminas de oligonucleotídeos com base no banco de dados www.candidagenoma.org. Genes induzidos de *C. albicans* SC5314 incubada com SBTX por 18 horas (n = 40).

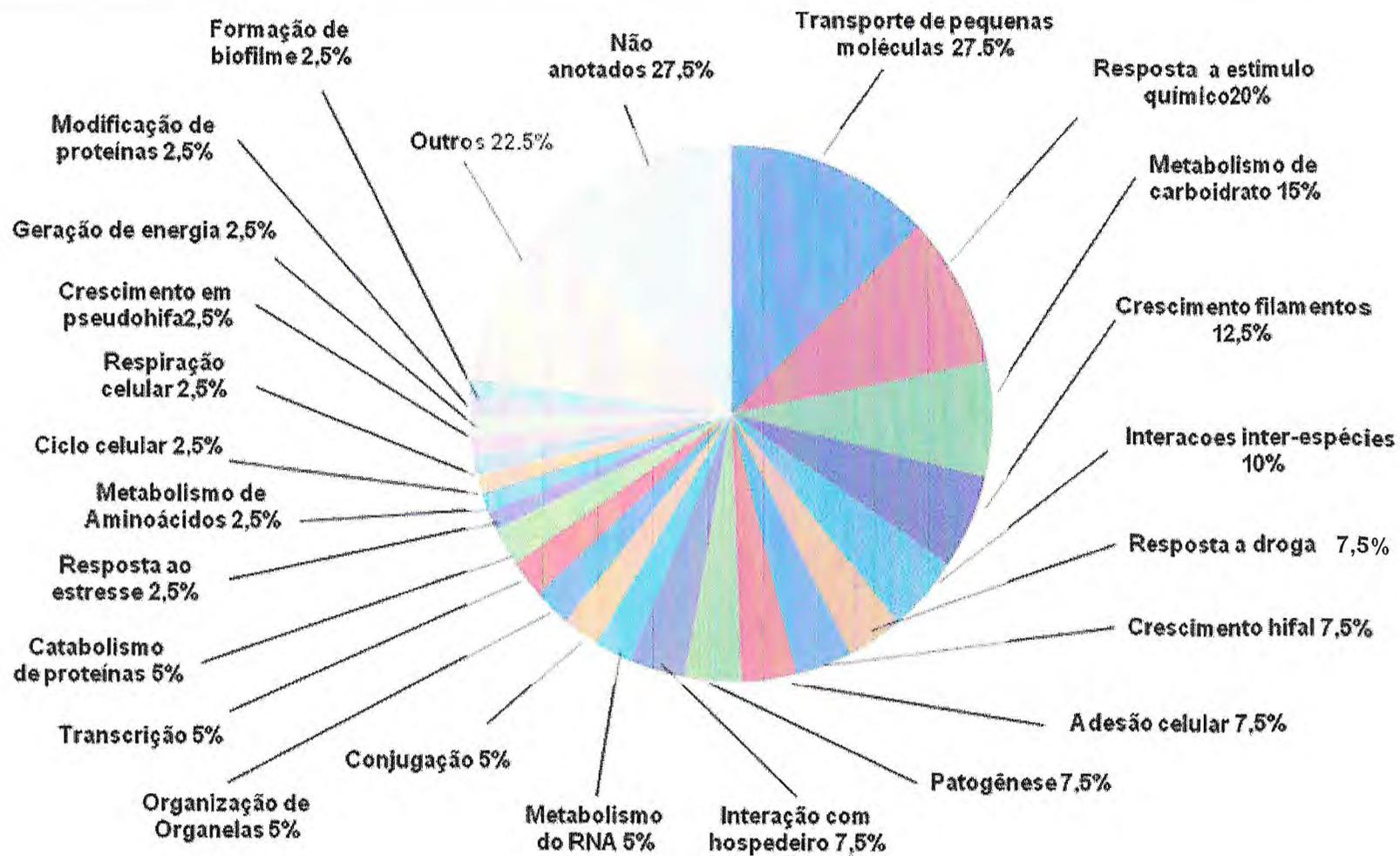


FIGURA 15 - Categorização funcional das ORF's ("Open Reading Frames") immobilizadas nas lâminas de oligonucleotídeos com base no banco de dados www.candidagenoma.org. Genes induzidos em *C. albicans* SC5314 incubada com SBTX por 20 horas (n = 40)

TABELA 02 – Categorização funcional em percentagem dos genes induzidos em *C. albicans* por SBTX por 18 e 20 horas

Categorização funcional	18 horas (%)	20 horas (%)
Adesão celular	-	7,5
Catabolismo de proteínas	-	5
Ciclo celular	7,7	2,5
Conjugação	-	5
Crescimento filamentosos	10,3	12,5
Crescimento hifal	7,7	7,5
Desenvolvimento celular	2,6	-
Formação de biofilme	-	2,5
Geração de energia	-	2,5
Geração de precursores metabólicos	5,1	-
Homeostase celular	2,6	-
Interação com hospedeiro	2,6	-
Interação com hospedeiro	-	7,5
Interações entre organismos	5,1	-
Metabolismo de aminoácidos	-	2,5
Metabolismo do RNA	-	5
Modificação de proteínas	2,6	2,5
Modificação de proteínas	-	2,5
Não anotados	25,6	27,5
Não mapeados	12,8	-
Organização de organelas	5,1	5
Outros	-	22,5
Patogênese	5,1	-
Processo metabólico de carboidratos	7,7	-
Processo metabólico de lipídios	2,6	-

Processos metabólicos de aminoácidos	5,1	-
Respiração celular	5,1	2,5
Resposta a droga	12,8	7,5
<i>Resposta a estímulo químico</i>	15,4	-
Resposta a estresse	5,1	2,5
Transcrição	2,6	5
Transdução de sinal	10,3	-
Transporte de pequenas moléculas	26	-
Metabolismo de carboidratos	-	15
Crescimento filamentososo	-	2,5

Dos 63 genes de *C. albicans* SC5314 que foram responsivos a SBTX, através do contato por 18 horas, 40 deles tiveram um aumento do nível de expressão. Alguns destes integram processos celulares envolvidos no transporte de pequenas moléculas, na resposta a estresse e a drogas, metabolismo de carboidratos e aminoácidos, respiração celular e patogênese, dentre outros como mostra a Tabela 03. Por outro lado, 23 genes do total de 63 foram reprimidos, alguns deles envolvidos no processo metabólico do RNA, ciclo celular, na respiração celular, transdução de sinal, dentre outros como ilustrado na Tabela 04.

Quando considerada a incubação da levedura com SBTX por 20 horas, 51 genes foram responsivos. Cerca de 40 deles foram induzidos, estando esses genes envolvidos em vários processos celulares, tais como transporte de pequenas moléculas, ciclo celular, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, transcrição, respiração celular, dentre outros, como mostra a Tabela 05. Contrariamente, 11 deles tiveram uma expressão reprimida, estando relacionados a processos de organização de organelas e transdução de sinal, metabolismo de aminoácidos e patogênese, conforme mostra a Tabela 06.

5.8.4 Validação dos Genes por Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-qPCR)

A PCR quantitativa foi realizada para confirmar os níveis de expressão dos genes *RIM101*, *TUP1*, *AOX2* e *HGT1*, que foram induzidos em microarranjos de DNA. Os níveis de aumento na indução foram maiores em PCR quantitativo quando comparados com microarranjos. Embora os níveis de expressão tenham sido diferentes entre os resultados obtidos em microarranjos e em PCR quantitativo, a tendência de indução da expressão foi mantida (TABELA 07).

5.9 Avaliação da Atividade da SBTX Sobre o Crescimento de *C. albicans* *dTUP1* e *C. albicans* *dRIM101*

Assim como descrito no item 5.2, SBTX foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* selvagem (FIGURA 16A) na concentração de 250 µgP/mL. Em *C. albicans* *dTUP1* (FIGURA 16B) também foi observada inibição do crescimento,

porém houve uma redução na atividade inibitória da SBTX, ainda que a concentração utilizada tenha sido mantida. O mesmo foi verificado para *C. albicans dRIM101* (FIGURA 16C). Nenhuma alteração morfológica foi verificada para as células selvagens (FIGURA 17B), *C. albicans dTUP1* (FIGURA 17D) e *C. albicans dRIM101* (FIGURA 17F), quando comparadas aos seus respectivos controles (FIGURAS 17A, 17C e 17E).

TABELA 03 - Categorização funcional de alguns genes que foram induzidos em células de *C. albicans* SC5314 incubadas com SBTX por 18 horas

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
Transporte de pequenas moléculas	<i>TNA1</i>	orf19.4335	1,42	Putativo transportador de ácido nicotínico
	<i>HGT1</i>	orf19.4527	1,18	Putativo transportador de glicose
	<i>HGT7</i>	orf19.2023	1,6	Putativo transportador de glicose
	<i>HGT2</i>	orf19.3668	1,14	Putativo transportador de glicose
	<i>PET9</i>	orf19.930	0,92	Proteína envolvida na biossíntese do ATP
	<i>SFT1</i>	orf19.3234.1	0,79	Proteína envolvida no transporte mediado por vesículas intra-Golgi
	<i>CAN1</i>	orf19.97	1,34	Permease de aminoácidos, transportador de aminoácidos básicos
	<i>MAL31</i>	orf19.3981	0,92	Proteína com atividade de transportador de açúcar transmembrana
Resposta a estímulos químicos, estresse e a drogas	<i>RIM101</i>	orf9.7247	1,18	Fator de transcrição envolvido em respostas a pH alcalinos
	<i>HGT1</i>	orf19.4527	1,18	Putativo transportador de glicose
	<i>HGT7</i>	orf19.2023	1,6	Putativo transportador de glicose
	<i>GAL10</i>	orf19.3672	0,83	UDP-glucose4-epimerase requerida para utilização de glicose
	<i>CRZ1</i>	orf19.7359	0,89	Putativo fator de transcrição

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
Metabolismo de carboidratos	<i>MLS1</i>	ofr19.4833	0,94	Malato sintase, enzima do ciclo do glioxilato
	<i>FOX2</i>	orf19.1288	1,16	3-hidroxiacil-CoA epimerase requerida para oxidação de lipídeos
	<i>GAL10</i>	orf19.3672	0,83	UDP-glucose4-epimerase requerida para utilização de glucose
Metabolismo de aminoácidos	<i>ARG1</i>	orf19.7469	0,93	Enzima da biossíntese da arginina, similar a argininosuccinato
	<i>ARG3</i>	orf19.5610	0,89	Enzima da biossíntese da arginina, similar a argininosuccinato
Crescimento filamentoso	<i>RIM101</i>	orf9.7247	1,18	Fator de transcrição envolvido em respostas a pH alcalinos
	<i>PCL5</i>	orf19.4012	0,99	Proteína com atividade reguladora quinase dependente de ciclina
	<i>GAL10</i>	orf19.3672	0,83	UDP-glucose4-epimerase requerida para utilização de galactose
Ciclo Celular	<i>CRZ1</i>	orf19.7359	0,89	Putativo fator de transcrição
	<i>RIM101</i>	orf9.7247	1,18	Fator de transcrição envolvido em respostas a pH alcalinos
	<i>PCL5</i>	orf19.4012	0,99	Proteína com atividade reguladora quinase dependente de ciclina
Patogêneses	<i>FOX2</i>	orf19.1288	1,16	3-hidroxiacil-CoA epimerase requerida para oxidação de lipídeos
	<i>RIM101</i>	orf9.7247	1,18	Fator de transcrição envolvido em respostas a pH alcalinos
Respiração celular	<i>AOX2</i>	Orf.4773	1,86	Oxidase alternativa
	<i>PET9</i>	orf19.3234.1	0,92	Proteína envolvida na biossíntese do ATP

TABELA 04 - Categorização funcional de alguns genes que foram reprimidos em células de *C. albicans* SC5314 incubadas por 18 horas

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
Processo metabólico de RNA	<i>NUP49</i>	orf19.4987	-1,29	Proteína nuclear de poro
	<i>PES1</i>	orf19.7050	-1,43	Participa da biogênese do ribossomo
Ciclo celular	<i>PCL2</i>	Orf19.403	-0,81	Proteína homóloga a ciclina regulada por farnesol
	<i>PES1</i>	orf19.7050	-1,43	Participa da biogênese do ribossomo
Metabolismo de aminoácidos	<i>TRP1</i>	orf19.6096	-0,78	Fosforibosilatrnilato isomerase; enzima da biossíntese de aminoácidos
Respiração celular	<i>TAR1</i>	orf19.6834.10	- 1,80	Proteína envolvida na regulação da expressão celular
	<i>MRP20</i>	orf19.3350	-1,03	Proteína descrita como componente do ribossomo mitocondrial
Transdução de sinal	orf19.3216	orf19.3216	-0,72	Similar a ativadores GTPase Rab
	orf19.4253	orf19.4253	-0,77	Atividade ativador de Ras GTPase

TABELA 05 - Categorização funcional de alguns genes que foram induzidos em células de *C. albicans* SC5314 incubadas com SBTX por 20 horas

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
Transporte de pequenas moléculas	<i>HGT2</i>	orf19.3668	2,21	Putativo transportador de glicose
	<i>SHA3</i>	orf19.3669	0,78	Proteína similar a uma serina quinase envolvida no transporte de glicose
	<i>HGT10</i>	orf19.5753	0,89	Glicerol permease, envolvida na aquisição de glicerol
	<i>GAP2</i>	orf.6993	1,30	Proteína similar a uma permease para aminoácido
	<i>HGT1</i>	orf19.4527	1,18	Proteína Transportadora de glicose
	<i>GAL1</i>	orf19.3670	0,86	Galactoquinase
	<i>HXT5</i>	orf19.4384	1,84	Proteína descrita como um transportador de glicose
	<i>PAN1</i>	orf19.886	1,23	Proteína essencial envolvida em endocitose e crescimento polarizado
Resposta a estímulos químicos, estresse e a drogas	<i>GAL102</i>	orf19.3674	0,90	UDP-glucose4-epimerase envolvida na utilização de galactose
	<i>ALS1</i>	orf19.5741	0,75	Adesina, Pertencente à família ALS, papel na adesão
	<i>ALS4</i>	orf19.4555	1,08	Adesina, Pertencente à família ALS, papel na adesão
	<i>SHA3</i>	orf19.3669	0,78	Proteína similar a uma serina quinase envolvida no transporte de glicose
	<i>TUP1</i>	orf19.6109	0,97	Transcripcional Corepressor, reprime crescimento hifal.

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
	<i>HGT1</i>	orf19.4527	1,18	Proteína Transportadora de glicose
	<i>GAL1</i>	orf19.3670	0,86	Galactoquinase
Metabolismo de carboidratos	<i>GAL10</i>	orf19.3672	1,32	UDP-glucose-4-epimerase requerida para utilização de galactose
	<i>GAL102</i>	orf19.3674	0,9	UDP-glucose-4-epimerase envolvida na utilização de galactose
	<i>GAL7</i>	Orf19.3675	0,93	Galactoquinase
	<i>GAL1</i>	orf9.3670	0,86	Galactoquinase; transcrição regulada por galactose
	<i>PCK1</i>	orf19.7514	0,81	Fosfoenolpiruvato carboxilase; papel na gliconeogêneses
	<i>GAL10</i>	orf19.3672	0,83	UDP-glucose4-epimerase requerida para utilização de glucose
	<i>ICL1</i>	orf19.6844	1,63	Isocitrato liase; enzima do ciclo do glioxilato,
Crescimento filamentoso	<i>ALS1</i>	orf19.5741	0,75	Adesina, Pertencente à família ALS, papel na adesão
	<i>ALS4</i>	orf19.4555	1,08	Adesina, Pertencente à família ALS, papel na adesão
	<i>SHA3</i>	orf19.3669	0,78	Proteína similar a uma serina quinase envolvida no transporte de glucose
	<i>TUP1</i>	Orf19.6109	0,97	Co- repressor transcricional, reprime crescimento hifal.
	<i>GAL10</i>	orf19.3672	1,32	UDP-glucose4-epimerase requerida para utilização de galactose
Ciclo celular	<i>PAN1</i>	orf19.886	1,23	Proteína essencial envolvida em endocitose e crescimento polarizado
Transcrição	<i>HAP41</i>	Orf19.740	1,98	Ativador transcricional

	<i>TUP1</i>	Orf19.6109	0,97	Co- repressor transcricional, reprime crescimento hifal,
Organização da parede celular	<i>PGA37</i>	orf19.3923	1,25	Putative GPI-ancorada proteína,
Respiração celular	<i>AOX2</i>	Orf19.4773	1,92	Oxidase alternativa
	<i>ALS1</i>	orf19.5741	0,75	Adesina, Pertencente à família ALS das GPI- ancorada proteína
	<i>ALS4</i>	orf19.4555	1,08	Adesina, Pertencente à família ALS das GPI-ancorada proteína
	<i>TUP1</i>	Orf19.6109	0,97	Co- repressor transcricional, reprime crescimento hifal.

TABELA 06 - Categorização funcional de alguns genes que foram reprimidos em células de *C. albicans* SC5314 incubadas com SBTX por 20 horas

Go Termo	Gene	Hyperlink	Log ₂	Descrição do produto gênico
Organização de organelas e transdução de sinal	<i>HHT21</i>	Orf19.1061	-1,81	Putativa Histona H3 regulada por farnesol
	<i>HHF1</i>	Orf19.1059	-1,08	Putativa Histona H4 regulada por farnesol
	<i>HHT2</i>	Orf19.1853	-1.77	Proteína descrita com Histona H3
Metabolismo de aminoácidos	<i>GCV1</i>	orf19.5519	-0,81	Proteína descrita como subunidade T da glicina descarboxilase
Resposta a Estresse	<i>PSF1</i>	Orf19.6910	-0.88	Proteína envolvida na replicação do DNA
Patogêneses	<i>WH11</i>	Orf19.3548.1	-1,01	Proteína citoplasmática

TABELA 07 - Confirmação da expressão gênica diferencial em microarranjos usando PCR quantitativo

GeneSímbolo	ORF	Fold Change (Log ₂ -Escala)	
		qPCR	Microarranjo
<i>RIM101</i>	orf19.7274	6,95	1,18
<i>TUP1</i>	orf19.6109	3,11	0,97
<i>AOX2</i>	orf19.4773	4,67	1,92
<i>HGT1</i>	orf19.4527	3,79	1,18

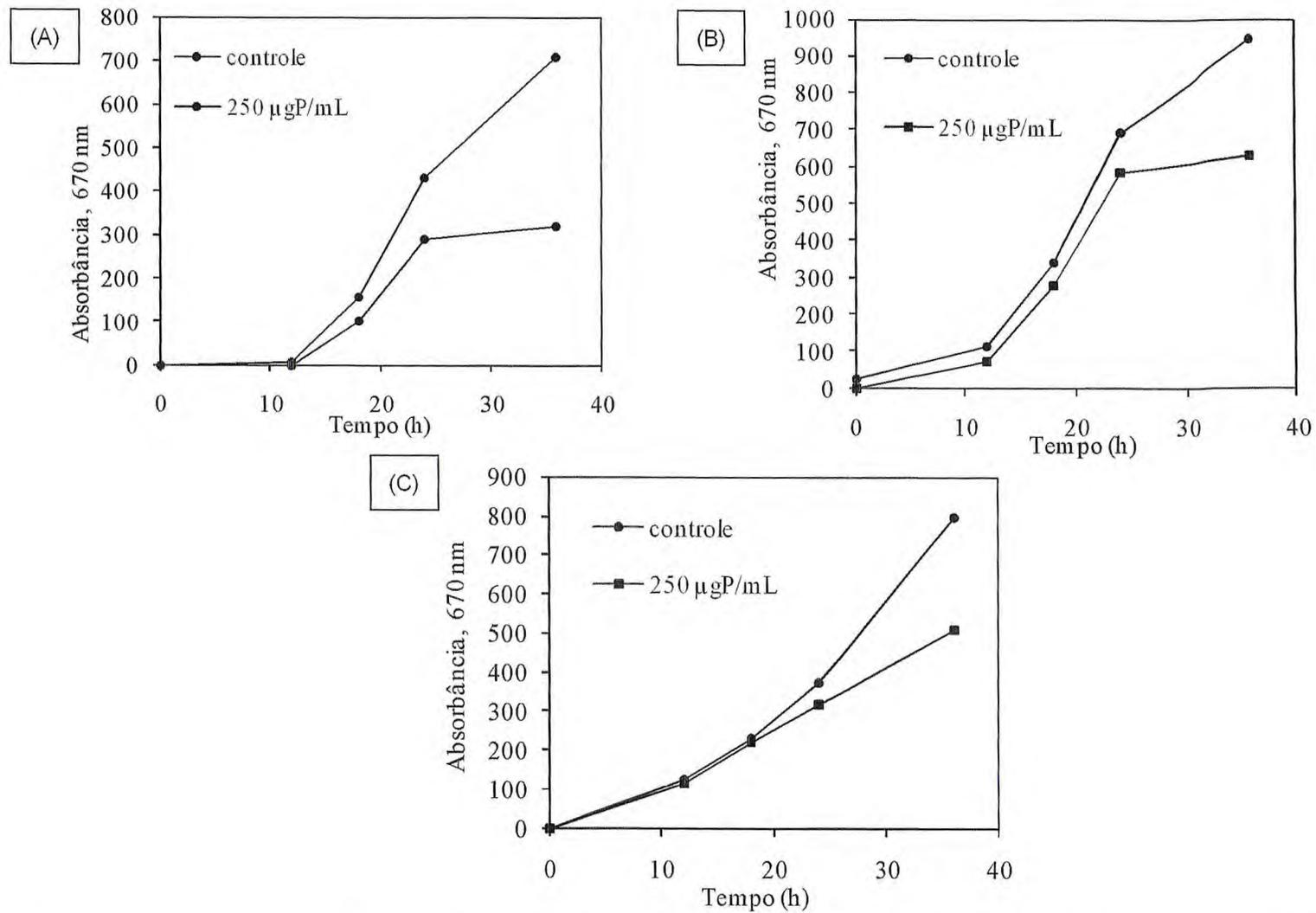


FIGURA 16 - Curvas de crescimento de *C. albicans* selvagem (A), *C. albicans* dTUP1 (B) e *C. albicans* dRIM101 (C) na presença de SBTX (250 µgP/mL) e na ausência da toxina (controle).

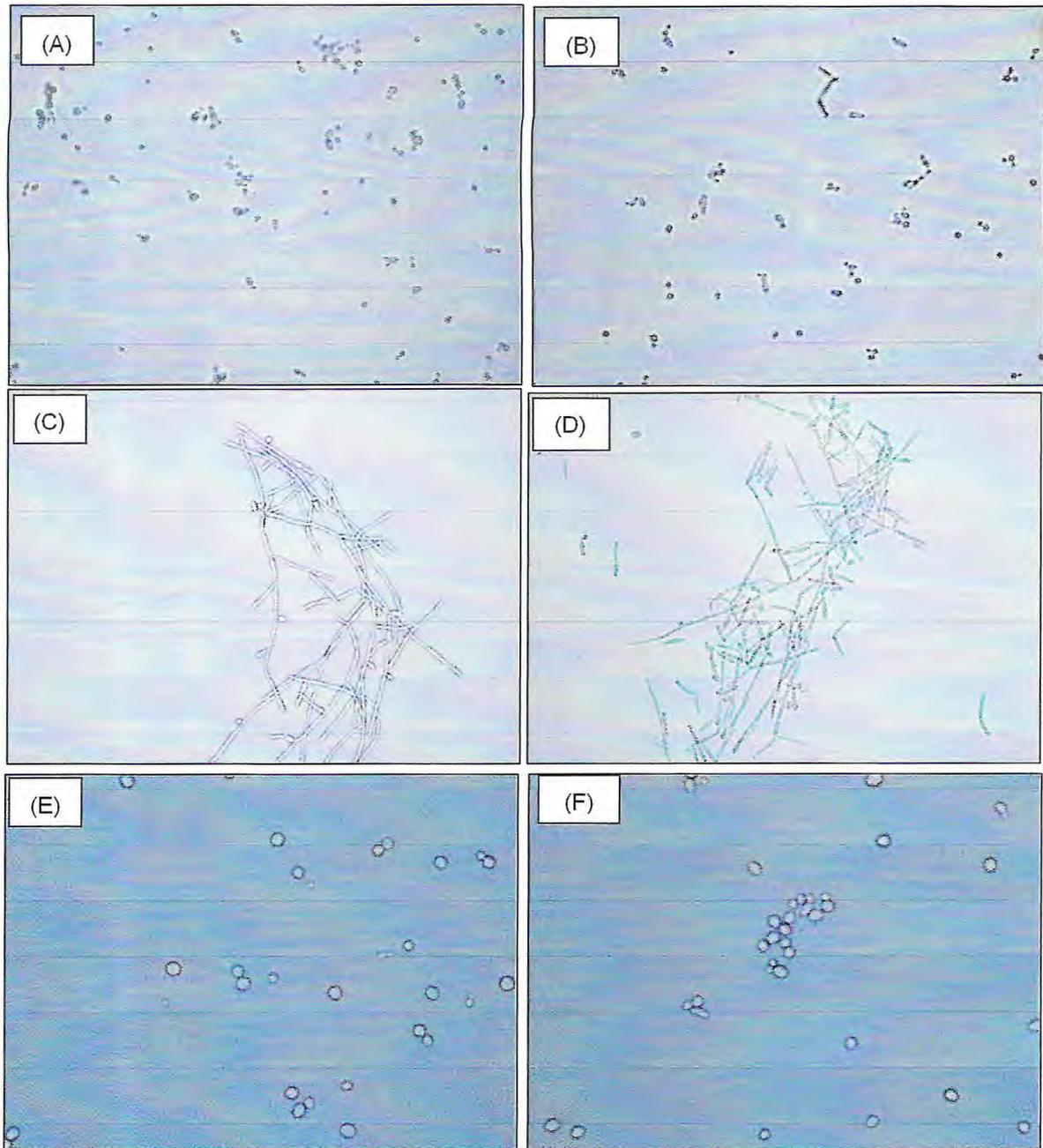


FIGURA 17 - Cepas da levedura *C. albicans* visualizadas em microscopia óptica na ausência de SBTX (A, C, E) e na presença de SBTX (B, D, F) (250 µg/mL). *C. albicans* selvagem (A, B), *C. albicans dTUP1* (C, D) e *C. albicans dRIM101* (E, F).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido focalizado na identificação de proteínas antifúngicas de origem vegetal. Entretanto, poucos têm demonstrado seus efeitos na morfologia, estrutura e, principalmente, na expressão gênica de fungos quando em presença desses compostos bioativos. Ademais, o mecanismo de ação de muitas dessas proteínas permanece ainda desconhecido. Então, para conhecer o espectro de ação e o mecanismo de inibição exercido pela SBTX contra fungos, as leveduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *P. membranifaciens* foram utilizadas como células modelo. Para avaliar o padrão de expressão gênico de *C. albicans* na presença da toxina, a técnica de microarranjos de DNA foi utilizada.

O primeiro passo consistiu em verificar o efeito inibitório da SBTX sobre leveduras, bem como em avaliar se a proteína causava alterações na morfologia dessas células. SBTX na concentração de 125 µg/mL inibiu o crescimento de *C. albicans* (54%) no período de 36 horas de incubação (FIGURA 03A), sendo essa concentração cerca de 60 vezes menor do que aquela letal para camundongos e três vezes inferior do que a encontrada em sementes (VASCONCELOS *et al.*, 2008). A concentração inibitória de SBTX para *C. albicans* está de acordo com a encontrada para outras proteínas e peptídeos antifúngicos descritos na literatura. Por exemplo, um peptídeo parcialmente purificado de sementes de *Amburana cearensis* inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 160 µg/mL (SANTOS *et al.*, 2010). Em contraste, SBTX não foi inibitória para *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis*, ainda que utilizada uma concentração de 400 µg/mL (FIGURAS 03B e 3C). De fato, para essas espécies, foi observado um aumento nas absorvâncias quando comparado com o controle, especialmente para *P. membranifaciens* (FIGURA 03C). Através de microscopia eletrônica de varredura, foram observadas alterações morfológicas caracterizadas como formação de pseudohifas em *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis*, promovidas por SBTX (FIGURAS 04D e 04F), uma vez que estas estavam ausentes nas células controles (FIGURAS 04C e 04E). Assim, o aumento nas absorvâncias observado nas Figuras 03B e 03C é explicado por essas alterações. A agregação de células foi cerca de dez vezes maior em *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* incubadas com SBTX, quando comparada ao controle. Interessantemente, SBTX

(125 µg/mL) inibiu o crescimento de *C. albicans*, mas não promoveu a formação de pseudohifas nessas células (FIGURA 04B). Osborn e colaboradores (1995) mostraram que defensinas isoladas de diferentes espécies de plantas causaram alterações morfológicas, em alguns, dos fungos testados. Uma proteína transferidora de lípideo (LTP) de sementes de pimenta também induziu formação de pseudohifas em *C. albicans* (DIZ *et al.*, 2006).

Normalmente, leveduras crescem como células únicas em forma elipsoidal chamada blastósporo ou blastoconídeo. Na presença de uma variedade de condições tais como escassez de nitrogênio e carbono, altas temperaturas, pH alcalino, alta taxa de CO₂ e O₂, essas células podem assumir formas filamentosas, nas quais elas continuam ligadas umas as outras depois da divisão e, assim, formam longas cadeias ramificadas de células conectadas. Tais formas filamentosas variam de pseudo (onde as células que formam filamentos alongados são ainda elipsoidais) a hifas verdadeiras (onde células muito alongadas formam os filamentos e são separados por paredes septais perpendiculares) (BRAUN; JOHNSON., 1997; IYER; DAS; BHAT, 2008). Em *S. cerevisiae*, a MAP quinase e vias AMPc-dependentes estão envolvidas na geração de pseudohifas (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000). Essa formação de pseudohifas parece ser uma reação fisiológica associada às condições de escassez de nutrientes e estresse. Em jejum, a formação de pseudohifas permitiria a captação de nutrientes que porventura presentes na vizinhança; sob a condição de estresse, que possibilitaria o escape de agentes nocivos (GANCEDO, 2001).

Várias proteínas antifúngicas têm a habilidade de causar interrupção na parede celular e membrana plasmática do fungo, levando a morte celular (SELITRENNIKOFF, 2001; FERREIRA *et al.*, 2007). Assim a capacidade da SBTX em permeabilizar a membrana plasmática de células de *C. albicans*, *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* foi também examinada após crescimento das células na presença da toxina (400 µg/mL), seguido do tratamento com "SYTOX Green" por 30 minutos. Fluorescência foi observada em *P. membranifaciens*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* indicando que as cepas de leveduras permitiram a penetração de "SYTOX Green" na presença de SBTX (FIGURAS 05D, 06D e 07D). Embora as células de *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* tenham formado pseudohifas como uma tentativa de defesa frente a SBTX, os resultados

aqui apresentados destacam os efeitos tóxicos desta proteína, já que a fluorescência é o resultado da absorção de "SYTOX Green" por comprometimento da membrana. Assim, as células de levedura foram, provavelmente, mortas devido à presença de SBTX. Permeabilização de membrana guiada por "SYTOX Green" em células de leveduras já foi verificada em tratamentos com outras proteínas e peptídeos antifúngicos de origem vegetal, tais como a albumina 2S de sementes de maracujá (AGIZZIO *et al.*, 2006), uma PTL de sementes de pimenta (DIZ *et al.*, 2006) e uma proteína denominada jucina de sementes de *Brassica juncea* (YE; NG, 2009).

Para testar se SBTX teria efeito sobre a capacidade das células de levedura em transportar prótons do meio intracelular para o externo, a acidificação do meio estimulada por glicose foi medida em *S. cerevisiae*. Este fenômeno é dependente da atividade H⁺-ATPase. A presença de SBTX (400 µg/mL) em meio de cultura inibiu a acidificação do meio externo em 27% (FIGURA 08), em comparação aos tratamentos controle. É provável que isso tenha ocorrido devido à permeabilização da membrana plasmática, como sugerido para a captação "SYTOX Green" e/ou, mesmo, pela interferência direta na bomba H⁺-ATPase. A bomba de prótons na membrana celular dos fungos é responsável pela homeostase do pH intracelular e manutenção do gradiente eletroquímico de prótons necessários para a absorção de nutrientes (MONK; PERLIN, 1994; KOTIK; LAPATHITIS; HORAK, 2003). Portanto, qualquer ruptura da membrana plasmática pode, direta ou indiretamente, alterar a sua função na translocação e tráfego de substâncias através da membrana, levando à morte celular (BENJOSEF *et al.*, 2000). Todavia, para exercer efeitos diretos sobre a membrana plasmática, SBTX teria que atravessar a parede celular. É sabido que a parede celular de *S. cerevisiae* é permeável a dextranas até 70 kDa (DE NOBEL *et al.*, 1989). Assim, SBTX, uma proteína de 44 kDa, poderia atravessar a barreira da parede celular e atingir a membrana plasmática, alterando sua função. Alternativamente, SBTX poderia interromper a parede celular facilitando seu contato com a membrana plasmática. Várias outras proteínas de plantas são capazes de inibir a acidificação do meio estimulada por glicose. Uma lectina isolada de *L. auriculata* (500 µg/mL) promoveu 60% de inibição da acidificação do meio externo em *S. cerevisiae* (MELO *et al.*, 2005). A fração F3 (2 µg/mL) e o peptídeo F1 (160 µg/mL) de sementes de pimenta causaram 100% de inibição da

acidificação do meio estimulada por glicose em células de *S. cerevisiae* (DIZ *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no intuito de avaliar alterações em estruturas celulares decorrentes da incubação com SBTX. Células de *P. membranifaciens* tratadas com SBTX (400 µg/mL) apresentaram disrupção na parede celular (FIGURAS 09C e 09D). Alterações como condensação, retração do citoplasma fortemente granuloso, além do aumento da vacuolização e perda da estrutura normal e conteúdo foram ainda observadas (FIGURAS 09A e 09B). Desarranjo estrutural da membrana plasmática causada pela presença de SBTX foi verificado também pelo tratamento com “SYTOX Green” (FIGURAS 05C e 06D). Estes dados em conjunto sugerem que as propriedades antifúngicas de SBTX estão relacionadas diretamente com alterações na superfície da célula. Por outro lado, modificações morfológicas de *C. albicans* na presença de SBTX não foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 09E), similar aos resultados de microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 04B). Perda de assimetria, deformações e aglomerados foram detectados em células de *S. cerevisiae* incubadas com Pf2 (100 µg/mL), uma proteína homóloga a albumina 2S de sementes de maracujá (AGIZZIO *et al.*, 2006).

Tendo o conhecimento que SBTX era capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* sem, contudo, comprometer a morfologia e a ultra-estrutura dessas células, o próximo passo foi avaliar se essa inibição seria devido a uma reprogramação gênica nessas células. Para isso, a técnica de microarranjos de DNA foi utilizada. Vários são os sinais e sensores envolvidos na morfogênese e na regulação gênica de *C. albicans*, dentre eles glucose, pH, aminoácidos, oxigênio, gás carbônico, farnesol, *N*-acetilglucosamina, amônio e estresse osmótico (COTTIER; MÜHLSCHLEGEL, 2009). Após 18 e 20 horas de incubação de *C. albicans* com SBTX (200 µg/mL), houve aumento da expressão de genes envolvidos no transporte de pequenas moléculas (FIGURAS 14 e 15), sendo alguns desses codificadores para transportadores de glucose como *HGT1*, *HGT2*, *HGT7*, *HGT10* e *HXT5* (TABELAS 03 e 05). Devido à importância da glucose como fonte de energia, bem como do seu papel na morfogênese, células de leveduras possuem um grande número de transportadores de hexoses (SABINA e BROWN, 2009). De fato, *C. albicans* possui mais de 20 transportadores de hexoses, que são proteínas transmembranas formadoras de poros seletivos na

membrana plasmática, facilitando a absorção de glicose para as células (FAN *et al.*, 2002; SABINA e BROWN, 2009). Um estudo de microarranjos verificou que Hgt4, uma proteína transmembrana que funciona como sensor de glicose, gera *um sinal intracelular que induz a expressão dos genes HGT7, HGT1 e HGT2*, sendo isso requerido para o crescimento sobre fontes de carbono fermentáveis, crescimento filamentosos e virulência (BROWN *et al.*, 2006). Além disso, genes *HGT* são ativados somente quando a glicose é escassa no meio, sendo necessárias outras fontes de energia (SEXTON *et al.*, 2007).

Além de glicose, aminoácidos também funcionam como sensores para morfogênese em *C. albicans* (COTTIER; MÜHLSCHLEGEL, 2009). Interessantemente, genes que codificam permeases para esses metabólitos, como *CAN1* e *GAP2*, foram induzidos em *C. albicans* incubadas com SBTX por 18 e 20 horas, respectivamente (TABELAS 03 e 05). A família de permeases de aminoácidos consiste de um grande número de proteínas de membrana que medeiam o transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (VAN BELLE; ANDRE, 2001). Brega, Zufferey, e Mamoun (2004) mostraram que o sensor de aminoácido Cys1p é uma proteína importante que desempenha papel crítico na absorção de aminoácidos e no crescimento filamentosos de *C. albicans*. De fato, os autores demonstraram que a inativação de *CSY1* leva a uma falha na indução das permeases de aminoácidos codificadas pelos genes *CAN1*, *GAP1* e *GAP2* na presença de histidina.

Uma importante propriedade física que altera a morfologia de *C. albicans* é o pH do meio. De fato, *C. albicans* modifica sua morfologia dependendo do valor de pH, que vai desde o crescimento leveduriforme em condições ácidas até a formação de hifas em meio alcalino (DAVIS, 2003). Na presença de SBTX, houve aumento da expressão do gene *RIM101* em células de *C. albicans* (TABELA 02). Nessas células, o sensor de pH é uma proteína Rim21p localizada na membrana plasmática que, após detecção de pH alcalino, ativa uma via de sinalização, culminando com a ativação do gene *RIM101*. Uma vez que a proteína Rim101p é ativada, esta promove alterações na transcrição de genes necessários para o crescimento em pH neutro e alcalino, bem como para a patogênese (DAVIS, 2009). No presente trabalho foi selecionada uma cepa de *C. albicans* com deleção nesse gene para verificar se a ausência dele levaria ao aumento ou à redução da sensibilidade dessas células a toxina. As cepas de *C. albicans*

dRIM101 mostraram-se menos susceptíveis a atividade inibitória de SBTX (250 µg/mL) (FIGURA 16B), além de não terem apresentado alteração morfológica (FIGURA 17F). Lis e colaboradores (2010) verificaram que essa deleção também tornou as cepas menos sensíveis ao peptídeo MUC7. Os autores sugeriram, que a deleção desse gene pode ter levado a alterações ou ajustes na membrana plasmática, resultando na diminuição da ligação do peptídeo e, como consequência, reduzindo sua atividade. Assim, o mesmo pode ter acontecido para a SBTX.

Como relatado, vários sensores envolvidos na morfogênese de *C. albicans* foram induzidos na presença de SBTX, o que poderia ter levado à formação de pseudohifas ou hifas. Entretanto, alterações na morfologia e estrutura dessas células não foram verificadas (FIGURAS 04B, 07B e 09E), provavelmente porque o gene *TUP1* que codifica um fator de transcrição, envolvido na repressão do crescimento filamentos, foi também induzido em *C. albicans* na presença de SBTX (TABELA 05). De fato, a ativação e inibição do desenvolvimento filamentos são acompanhadas, em grande parte, por mudanças na expressão gênica mediada por ativadores e repressores transcricionais (KEBAARA *et al.*, 2008). Por exemplo, Efg1p e Cph1p são os principais fatores de transcrição que regulam o crescimento filamentos em *C. albicans* (ECKERT *et al.*, 2007). Já Tup1p tem um papel principal na repressão transcricional, que bloqueia o desenvolvimento filamentos (BRAUN; JOHNSON, 2000). Por sua vez, o gene *TUP1* é regulado por farnesol, um sesquiterpeno produzido a partir de farnesil pirofosfato, um intermediário da biossíntese dos esteróis, e secretado extracelularmente por *C. albicans* (HORNBY *et al.*, 2001). Uma hipótese poderia ser de que SBTX tenha levado a síntese de farnesol, regulando não apenas *TUP1*, mas, também, outros genes como *HHF1* e *HHT21* (TABELAS 05 e 06). Quando farnesol acumula acima de um limiar, *C. albicans* pode impedir a conversão da forma de levedura para a forma de micélio e posterior formação de biofilmes (RAMAGE *et al.*, 2002). Biofilmes em *C. albicans* são compostos de uma mistura de tipos de células, incluindo as células leveduriformes, as pseudohifas e hifas, além de uma matriz constituída de polissacarídeos extracelulares e proteínas. Biofilmes são altamente resistentes aos fármacos (CHANDRA *et al.*, 2001; DOUGLAS, 2003). Interessantemente, cepas de *C. albicans dTUP1*, com deleção para o gene *TUP1*, mostraram-se menos sensíveis a SBTX,

evidenciando, pelo menos em parte, a importância da presença desse gene para a atividade inibitória dessa proteína (FIGURA 16B). Crescimento filamentososo foi verificado em cepas *C.albicans dtUP1* na ausência de SBTX (FIGURA 17C), bem como em cepas tratadas com a toxina (FIGURA 17D), comprovando o papel do gene *TUP1* em reprimir o crescimento filamentososo em *C. albicans*.

Pelo exposto, até o presente momento, é possível que a SBTX imponha uma condição de estresse em células de *C. albicans*. Essa condição é percebida por várias moléculas atuando como sensores presentes na membrana celular que, nessa situação, deveriam induzir *C. albicans* a formar pseudohifas ou hifas, no intuito de se proteger das condições hostis ocasionadas pela presença de SBTX. Entretanto isso não foi verificado, uma vez que a toxina levou a síntese de farnesol e, conseqüentemente, ativação do gene *TUP1* que, por sua vez, inibiu a morfogênese. A Figura 18 mostra um esquema exemplificando essa situação.

Já em relação ao efeito inibitório de SBTX no crescimento de células de *C.albicans*, este deve ter sido causado, em parte, pela condição de inanição verificada, sendo esta suposição reforçada pelo fato de que a SBTX teve atividade na bomba H^+ -ATPase. Vale lembrar que a bomba de prótons na membrana celular dos fungos é responsável pela homeostase do pH intracelular e manutenção do gradiente eletroquímico de prótons, necessários para a absorção de nutrientes (MONK; PERLIN, 1994; KOTIK; LAPATHITIS; HORAK, 2003). De fato, apesar de o meio Sabouraud conter em sua composição 2% de glucose, é possível que *C. albicans* estivesse em condição de inanição na presença da SBTX, uma vez que o gene *PCK1* relacionado com a gliconeogênese, que codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase, foi induzido na presença da toxina (TABELA 05). Gluconeogênese é a rota pela qual é produzida glucose a partir de compostos aglicanos (não-açúcares ou não-carboidratos), tais como glicerol e aminoácidos (ESCHRICH *et al.*, 2002). De fato, genes para permeases de aminoácidos (*CAN1*) e glicerol (*HGT10*) foram induzidos em *C. albicans* na presença de SBTX (TABELAS 02 e 04).

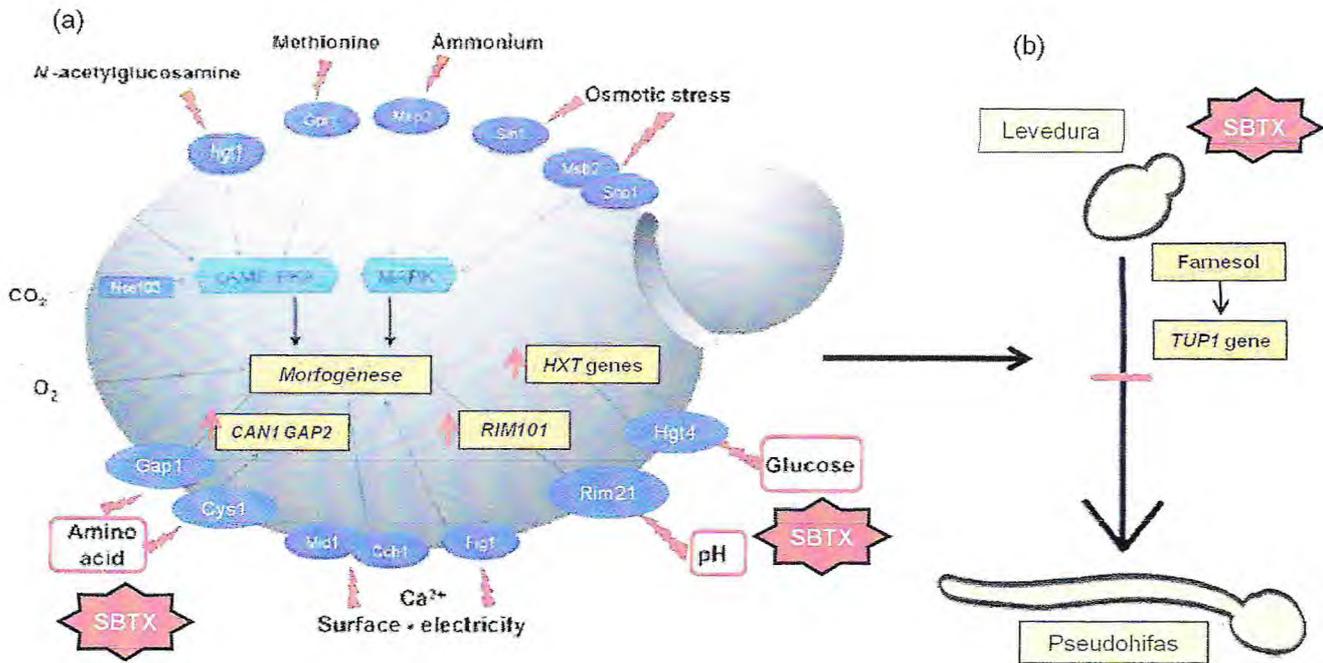


FIGURA 18 – Esquemas representativos ilustrando os sensores que foram ativados em *C. albicans* por SBTX. (a) Setas em vermelho indicam que os genes *HXT*, *CAN1*, *GAP2* e *RIM101* foram induzidos por SBTX, o que deveria culminar com a morfo gênese. (b) Na presença da toxina, houve a síntese de farnesol por *C. albicans* e, conseqüentemente, ativação do fator de transcrição Tup1p, impedindo a formação de pseudohifas. Fonte: Figuras adaptadas de Cottier e Mühlischlegel (2009) e Sabina e Brown (2009).

Além de a gluconeogênese ter sido ativada em *C. albicans*, genes que codificam as principais enzimas do ciclo do glioxilato, isocitrato liase (*ICL1*) e malato sintase (*MLS1*), foram também induzidos nessas células na presença da toxina (TABELAS 03 e 05). O ciclo do glioxilato, presente em bactérias, leveduras e vegetais, permite a utilização de fontes de carbono não fermentáveis, tais como o acetato, etanol e ácidos graxos, convertendo o acetil-CoA produzido em compostos C4, que podem ser usados para a biossíntese de macromoléculas (KORNBERG; KREBS, 1957). Resumidamente, no ciclo do glioxilato, o isocitrato origina o succinato e o glioxilato. O succinato regenera o oxaloacetato e o glioxilato se condensa com acetil-CoA formando o malato. Este passa para o citosol, onde origina oxaloacetato, que pode ser transformado em glucose pela gliconeogênese. O ciclo de glioxilato, desta forma, permite a conversão de acetil-CoA e, portanto, de ácidos graxos, em glucose. De fato, *C. albicans* na presença de SBTX deve ter requerido ácidos graxos para prover a carência aparente de glucose no meio, uma vez que o gene *FOX2* que codifica a enzima 3-hidroxiacil-CoA epimerase, requerida para oxidação de lipídeos, foi induzido (TABELA 03).

Adicionalmente, além das vias alternativas já citadas, utilizadas por *C. albicans* para suprir a carência aparente de glucose, quando na presença da toxina, a levedura acionou também a via de Leloir para o metabolismo de galactose, uma vez que os genes *GAL10* e *GAL1*, que codificam UDP-glucose-4-epimerase e galactoquinase, respectivamente, foram induzidos (TABELA 05). Na maioria dos organismos, a conversão de D-galactose a glucose 1-fosfato é realizada pela ação de quatro enzimas que constituem a via de Leloir. Na primeira etapa desta via, β -D-galactose é epimerizada em α -D-galactose pela mutarotase galactose. O próximo passo envolve a fosforilação de α -D-galactose pela galactoquinase para produção de galactose-1-fosfato. A terceira enzima na via, galactose-1-fosfato uridiltransferase, catalisa a transferência de um grupo UMP de UDP- glucose a glucose 1-fosfato, gerando galactose 1-fosfato e UDP-galactose. Para completar o percurso, UDP-galactose é convertida em UDP- glucose pela UDP-galactose 4-epimerase (HOLDEN *et al.*, 2002).

Além do efeito ocasionado pela presença de SBTX no metabolismo de carboidratos de *C. albicans*, essa proteína interferiu em outros componentes essenciais para célula. Por exemplo, os genes que codificam as histonas H3 (*HHT21* e *HHT2*) e H4 (*HHF1*) foram reprimidos em *C. albicans* na presença de

SBTX (TABELA 05). Baixo teor de histona H4 compromete o crescimento de *C. albicans* (ZACCHI *et al.*, 2010). De fato, a cromatina é uma estrutura dinâmica composta de DNA e proteínas, que permite tanto um armazenamento eficiente como o uso da informação genética. A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, que é composto por histonas conservadas, H2B, H2A, H3 e H4, montado em um hetero-octâmero de dois dímeros H2A/H2B e um tetrâmero H3/H4. O DNA é enrolado ao redor do nucleossomo, constituindo o primeiro nível de compactação da cromatina. Devido a esta íntima relação com o DNA, histonas estão envolvidas em todos os processos associados com a estrutura e função da cromatina, incluindo a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA e com a segregação cromossômica (ZACCHI *et al.*, 2010). Histonas participam da regulação destes processos, fornecendo uma plataforma para transmissão de informações a outras proteínas (por exemplo, DNA e RNA polimerases), através de modificações pós-traducionais em seus resíduos (JENUWEIN; ALLIS, 2001; TAVERNA *et al.*, 2007) e da ocupação nucleossomal de regiões reguladoras no DNA (WORKMAN, 2006; LI; CAREY; WORKMAN, 2007). Assim, as histonas constituem os principais reguladores da atividade da cromatina. Alterações na disponibilidade de histona têm efeitos profundos sobre a célula (ZACCHI *et al.*, 2010). Uma estequiometria desequilibrada dos dímeros de histona causa defeitos na segregação de cromossomos mitóticos, aumenta a recombinação e instabilidade genética e leva a defeitos na esporulação de *S. cerevisiae* (PRADO; AGUILERA, 2005). Além disso, a ocupação nucleossomal incompleta, devido a defeitos na dosagem de histona, impacta diretamente a regulação transcricional (LEE *et al.*, 2004). SBTX diminuiu também a expressão de um gene envolvido na biogênese do ribossomo (*PES1*) e de um gene que codifica uma proteína descrita como componente do ribossomo mitocondrial (*MRP20*) (TABELA 03).

Além das alterações já citadas, SBTX causou indução na expressão do gene que codifica uma oxidase alternativa (*AOX2*) (TABELA 05). A síntese de ATP na respiração de organismos é acoplada ao fluxo de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons para um acceptor final (HUH; KANG, 2001). Além desta via convencional, as plantas superiores, alguns protistas e muitos fungos, possuem uma via respiratória alternativa, resistente ao cianeto (HENRY; NYNS, 1965). Essa via de respiração parece ser mediada pela oxidase alternativa (*AOX*), que recebe os elétrons da ubiquinona reduzindo o oxigênio para água. O

fluxo de elétrons através da AOX não está atrelado à síntese ATP, portanto, a energia livre liberada a partir dessa via é perdida como calor (HUH; KANG, 2001). Aumentos na atividade da AOX foram observados em células vegetais após exposição a um número de condições de estresse, incluindo baixa temperatura, injúria, inibição da via do citocromo para o transporte de elétrons e inibição da síntese de macromoléculas (DAY *et al.*, 1995). Alguns relatos sugerem que espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxido e radical H_2O_2 , também induzem a expressão da AOX (WAGNER, 1995). Estas observações sugerem que a respiração resistente ao cianeto pode estar relacionada com os sistemas de defesa contra o estresse oxidativo, minimizando a geração de ROS em mitocôndrias. Em *C. albicans* mitocôndrias são capazes de gerar ROS que é liberada extracelularmente (SCHRÖTER *et al.*, 2000). Assim, a AOX estaria envolvida em impedir a formação de ROS, como ocorre em plantas (HUH; KANG, 2001). Dessa forma, a presença de SBTX pode ter levado a formação ROS em *C. albicans*. ROS podem reagir com ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares, ligações sulfidríla de proteínas e nucleotídeos (MACHLIN; BENDICH, 1987). Entretanto para confirmar a presença desses compostos nas células, ensaios posteriores devem ainda ser conduzidos.

Em consonância com o exposto, SBTX pode ter inibido o crescimento de *C. albicans* da forma apresentada, a seguir: ao atravessar a parede celular, acionou o sensor de glucose Hgt4 presente na membrana celular, alterou a assimilação de glucose e levou a ativação de outras rotas metabólicas como gliconeogênese, β -oxidação e via de Leloir, além de ter interferido nos níveis de outros componentes essenciais para a célula, tais como histonas e RNA e de ter induzido a formação ROS. SBTX pode ainda ter sido internalizada e causado toda essa reprogramação gênica. A Figura 19 ilustra um esquema proposto para o modo de ação da SBTX sobre células de *C. albicans*. A maioria dos fármacos antifúngicos conhecidos contra *C. albicans* atua na integridade da parede e/ou membrana celular. Entretanto, novos fármacos com atuação no metabolismo poderiam ser desenvolvidos (ASKEW *et al.*, 2009).

A tecnologia de microarranjos de DNA também foi utilizada por Lis e colaboradores (2010) para compreender o modo de ação do peptídeo antifúngico MUC7, derivado da região N-terminal da proteína mucina, contra *C. albicans*. Os

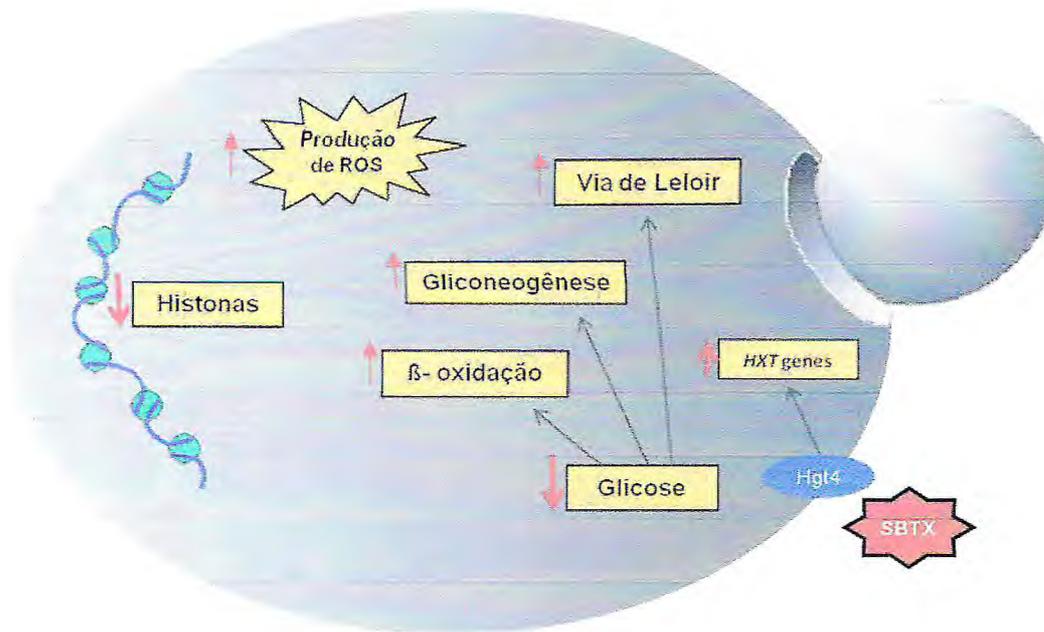


FIGURA 19 - Esquema representativo ilustrando o provável efeito de SBTX no crescimento de *C. albicans*. SBTX acionou o sensor de glicose Hgt4 presente na membrana celular, alterou a assimilação de glicose e levou a ativação de outras rotas metabólicas como gliconeogênese, β - oxidação e via de Leloir, além de ter interferido nos níveis de outros componentes essenciais para a célula, tais com histonas e RNA e de ter induzido a formação ROS. Fonte: Figura adaptada de Cottier e Mühlischlegel (2009).

autores detectaram genes diferencialmente expressos, que incluem aqueles envolvidos no estresse celular, no metabolismo do ferro, na manutenção da parede celular e no transporte de pequenas moléculas. Os resultados sugeriram, ainda, que a via cálcio-calcinerina tem um papel principal na adaptação de *C. albicans* ao peptídeo MUC7. Utilizando também essa tecnologia, foi verificado que Histatina 5, um peptídeo catiônico da saliva, inicia uma resposta de estresse osmótico, induzindo um rápido desbalanço de íons e perda de volume celular através da ativação da via MAP quinase (VYLKOVA *et al.*, 2007).

Assim sendo, os resultados obtidos através da tecnologia de microarranjos de DNA podem explicar, pelo menos em parte, o modo pelo o qual SBTX exerceu seu efeito no crescimento de *C. albicans*. Esses resultados foram ainda validados pela técnica de PCR quantitativa. Os genes selecionados para validação tiveram valores maiores no experimento de PCR quantitativo, quando comparado o experimento de microarranjos de DNA (TABELA 07). Diferenças no nível de expressão entre esses dois métodos foram relatadas anteriormente em diversos estudos (ITHAL *et al.*, 2007; TREMBLAY *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

SBTX é uma proteína antifúngica que impõe uma condição de estresse celular, cuja atuação se dá através de diferentes mecanismos. Para alguns fungos, *Pichia membranifaciens*, *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*, a toxina se mostrou capaz de alterar a permeabilidade da membrana, interferir na acidificação do meio e induzir alterações morfológicas, com posterior morte celular. Já com *C. albicans*, SBTX inibiu o crescimento e promoveu uma reprogramação gênica nessas células, havendo indução de genes relacionados com o transporte de pequenas moléculas, resposta a estímulos químicos, estresse e a drogas, além de genes ligados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos, à respiração e ao ciclo celular.

8. PERSPECTIVAS DO CAPÍTULO

Determinar a localização da SBTX em células de *C. albicans*, no intuito de avaliar se a toxina é internalizada ou se, de fato, atua na membrana celular, ligando-se a um receptor específico, verificar a presença de farnesol, bem como determinar a presença de espécies reativas de oxigênio em *C. albicans*, devem ser a próxima etapa para esse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIZZIO, A. P.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171 (4), p. 515-522, 2006.

AGNOL, A. D. Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja. Disponível em: <www.agrolink.com.br/colunistas/> Acesso em: 05 ago. 2009.

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. **Plant Pathology**. London, Academic Press., p. 97-115, 1997.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 13–16, 2001.

ARIMURA, G.; OZAWA, R.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; KOCH, T.; KÜHNEMANN, F.; TAKABAYASHI, J. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. **The Plant Journal**, v. 29, p. 87-98, 2002.

ASKEW, C.; SELLAM, A.; EPP, E.; HOGUES, H.; MULLICK, A.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 5 (10), p. 1- 20, 2009.

BAILEY, B. A.; STREMA, M. D.; BAEA, H.; MAYOLOB, G. A.; GUILTINAN, M. J. Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/or methyl jasmonate. **Plant Science**, v.168, p. 1247–1258, 2005.

BALDWIN, I. T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 8113–8118, 1998.

BARTINICKI-GARCIA, S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. **A Symposium of the Society for General Microbiology**, v.23, p. 245-267.1973

BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; MITIDIERI, S.; FEDER, V.; WASSERMANN, G. E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; FIUZA, L.; PASQUALI, G. M.; CARLINI, C. R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v.50, p. 971–983, 2007.

BEN-JOSEF, A. M.; MANAVATHU, E. K.; PLATT, D.; SOBEL, J. D. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of a novel complex carbohydrate: CAN-296. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 287-295, 2000.

BERTINI, L.; CAPORALE, C.; TESTA, M.; PROIETTI, S.; CARUSO, C. Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. **FEBS Letter**, v. 583 (17), p. 2865-2871, 2009.

BOCCARA, M.; SCHWARTZ, W.; GUIOT, E.; VIDAL, G.; DE PAEPE, R., DUBOIS, A.; BOCCARA, A. C. Early chloroplastic alterations analysed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. **Plant Journal**, v. 50, p. 338–346, 2007.

BOOTHROYD, J. C.; BLADER, M.; CLEARY, I.; SINGH, U. DNA microarrays in parasitology: strengths and limitations. **Trends in Parasitology**, v.19, p. 470–476, 2003.

BORMANN, C.; BAIER, D.; HERR, I.; RAPS, C.; BERGER, J.; JUNG, G.; SCHWARZ, H. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu 901 that interferes with growth polarity. **Journal Bacteriology**, v. 181, p. 7421–7429, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, B. R.; JOHNSON, A. D. Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor TUP1. **Science**, v. 277 (5322), p. 105 - 109, 1997.

BRAUN, B. R.; JOHNSON, A. D. TUP1, CPH1, and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. **Genetics**, v. 155, p.57-67, 2000.

BREGA, E.; ZUFFEREY, R.; MAMOUN, C. B. *Candida albicans* Csy1p is a nutrient sensor important for activation of amino acid uptake and hyphal morphogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 135-143, 2004.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69 (2), p. 55-59,1990.

BROWN, V.; SEXTON, J. A; JOHNSTON. M.. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p.1726–1737, 2006.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-29, 2002.

CARLINI, C. R.; BARCELLOS, G. B. S.; BAETA-NEVES, A. D. V.; GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, p. 25-30, 1988.

CÉLEBRES. Benefícios econômicos da biotecnologia agrícola no Brasil. Disponível em http://www.celeres.com.br/www.celeres.com.br/1/estudos/Rel_BiotechBenefits_2009_Economico.pdf. Acesso em. 25 jun. 2010.

CHADHA, P.; DAS, R. H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v. 225 (1), p. 213-222, 2006.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183 (18), p. 5385-5394, 2001.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Safras. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Soja>> Acesso em: 02 ago. 2010.

CONAB. Indicadores de agropecuária. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 17 de maio 2008.

COTTIER, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A. Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. **FEMS Microbiology Letters**, v. 295, p.1-9, 2009.

DAVIS D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. **Current Genetic**, v. 44, p.1-7, 2003.

DAVIS, D. A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Current Opinion Microbiology**, v.12, p. 365-370, 2009.

DAY, D. A; WHELAN, J.; MILLAR, A. H.; SIEDOW, J. N.; WISKICH, J. T. Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p. 497-509, 1995.

DE LAFONTEYNE, J.; SORMANN, M.; VAN DE COTTE, B. A method to protect foreign DNA from attack by plant cell DNase in transient expression assays involving dry embryos. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v. 55, p. 1403–1410, 1990.

DE NOBEL, J.G.; DIJKERS, C.; HOOIJBERG, E.; KLIS, F.M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2077-2084, 1989.

DEVAIAH, S. P.; MAHADEVAPPA, G. H.; SHETTY, H. S. Induction of systemic resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) against downy mildew (*Sclerospora graminicola*) by *Datura metel* extract. **Crop Protection**, v. 28 (9). p. 783-791. 2009.

DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. In: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, U.S, p. 156, 1995.

DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; DA CUNHA, M.; ALVES, E. A.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; OLIVEIRA, M. A.; PERALES, J.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1323-1332, 2006.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v.11, p. 30-36, 2003.

DOUGLAS, M. W.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Science**, v. 78, p. 91-95, 1999.

ECKERT S. E.; SHETH C. C.; MÜHLSCHLEGEL F. A. Regulation of morphogenesis in *Candida* species. In: d'Enfert C., Hube B., editors. *Candida: Comparative and Functional Genomics*. Wymondham, United Kingdom: **Caister Academic Press**, p. 263–291, 2007.

EGOROV, T. A.; ODINTSOVA, T. I.; PUKHALSKY, V. A.; GRISHIN, E. V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, v. 26, p. 2064-2073, 2005.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologia de produção da soja. Disponível em < <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/>> Acesso em: 12 jul. 2010.

ESCHRICH, D.; KÖTTER, P.; ENTIAN, K.-D. Gluconeogenesis in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 2 (3), p. 315–325, 2002.

FAN, J.; CHATURVEDI, V.; SHEN, S. H. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 55, p. 336-346, 2002.

FAO. The State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Agriculture Series**. No. 41, 2009.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages on soybean development. Ames: Iowa State University/Cooperative Extension Service. **Special Report**. n. 80: 11, 1977.

FEOFILOVA, E. P.; NEMTSEV, D. V.; TERESHINA, V. M.; MEMORSKAYA, A. S. Developmental change of the composition and content of the chitin–glucan complex in the fungus *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42 (6), p. 545-549, 2006.

FERNANDES, C. F.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; MORAES, V. C.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; ZHENJIA, C.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FINKINA, E. I.; SHRAMOVA, E. I.; TAGAEV, A. A.; OVCHINNIKOVA, T. V. A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. **Biochemistry Biophysics Research Community**. v. 371 (4), p. 860-865, 2008.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55 (402), p. 1445-1454, 2004.

GANCEDO, J. M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 107-123, 2001.

GARAIJAR, J.; BRENA, S.; BIKANDI, J.; REMENTERIA, A.; PONTO, J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. **FMES Yeast Research**, v. 6, p. 987-998, 2006.

GARAIJAR, J.; BRENA, S.; BIKANDI, J.; REMENTERIA, A.; PONTO, J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. **FMES Yeast Research**, v.6, p. 987-998, 2006.

GHOSH, M. Purification of a lectin-like protein from medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**. v. 80, p. 91-95, 2009.

GIFONI, J. M. **Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligante à quitina purificada de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2009.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30 (6), p. 503-512, 2002.

GOMES V. M.; BLANCO-LABRA A.; SALES M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CORDEIRO, R. A.; XAVIER-FILHO, J. Vicilin storage proteins from cowpea (legume) seeds inhibit fungal development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 4110-4115, 1997

GOMES, V. M.; DA CUNHA, M.; MIGUENS, F. C.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Ultrastructure and immunolabelling of fungi cells treated with *Vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins). **Plant Science**. v. 138, p. 81–89, 1998a.

GOMES, V. M.; OKOROKOV, L. A.; ROSE, T. L.; FERNANDES, K. V.; XAVIER-FILHO, J. Legume (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochemistry Biophysics Acta**. v. 1379, p. 207–216, 1998b.

GRAN, L.; SLETTEN, K.; SKJELDAL, L. Cyclic Peptides from *Oldenlandia affinis* DC. Molecular and Biological Properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 5 (10), p. 2014–2022, 2008.

HADJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J. W.; THELEN, J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, v. 137(4), p. 1397-1419, 2005.

HALL, D. A.; PTACEK, J.; SNYDER, M. Protein microarray technology. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128 (1), p. 161-167, 2007.

HAN, V.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of soybeans varying in trypsin inhibitor content. **Poultry Science**, v.70, p. 896-906, 1991.

HAROLD, F. M.; CALDWELL, J. H. Tips and currents: electrobiology of apical growth. In: **Tip Growth in Plant and Fungal Cells**, Heath, I. B. (ed.) Academic Press, San Diego, CA., p. 59-90, 1990.

HENRY, M. F.; NYNS, E. J. Cyanide-insensitive respiration: An alternative mitochondrial pathway. **Subcellular Biochemistry**, v. 4, p.1-65, 1965.

HERMAN, E. M.; HELM, R. M.; JUNG, R., KINNEY, A. J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**, v. 132 (1), p. 36-43, 2003.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11 (9), p.1026-1030, 1993.

HO, V. S. M.; WONG, J. K.; NG, T. B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, v. 28, p. 760-766, 2007.

HOLDEN, H. M.; RAYMENT, I.; THODEN, J. B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. **Journal Biology Chemistry**, v. 278 (45), p. 43885-43888, 2003.

HOLTORF, S.; LUDWIG-MÜLLER, J.; APEL, K.; BOHLMANN, H. High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Molecular Biology**, v. 36 (5), p. 673-680, 1998.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B., SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67 (7), p. 2982-2992, 2001.

HUH, W. K.; KANG, S. O. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **Biochemistry Journal**, v. 356, p.595-604, 2001.

ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; HEARNE, L.; THOMAS, J. T. M.; BAUM, M.; MITCHUM, G. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 20, p. 293-305, 2007.

IYER, R. S.; DAS, M.; BHAT, P. J. Pseudohyphal differentiation defect due to mutations in GPCR and ammonium signaling is suppressed by low glucose concentration: a possible integrated role for carbon and nitrogen limitation. **Current Genetic**, v. 54, p. 71-81, 2008.

JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **Plant Journal**, v. 8, p. 97–109. 1995

JANISICWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 411-41, 2002.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, p.1074–1080, 2001.

JI, C.; KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

KAMINSKYJ, S. G. W.; GARRILL, A.; HEATH, I. B. The relation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. **Experimental Mycology**, v.16 (1), p. 64-75, 1992.

KEBAARA, B. W.; LANGFORD, M. L.; NAVARATHNA, D. H.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L. *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous growth induction. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 980–987, 2008.

KERSCHGENS, J.; EGENER-KUHN, T.; MERMOD, N. Protein-binding microarrays: probing disease markers at the interface of proteomics and genomics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15 (8), p. 352-359, 2009.

KLIPP, E.; NORDLANDER, B.; KRUGER, R.; GENNEMARK, P.; HOHMANN, S. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. **Nature Biotechnology**, v. 23 (8), p.975 – 982, 2005.

KOO, A. J.; HOWE, G. A. The wound hormone jasmonate. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1571-1580, 2009.

KORNBERG, H. L.; KREBS, H. A. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. **Nature**, v.179, (4568) p. 988–991,1957

KOTIK, A.; LAPATHITIS, G.; HORAK, J. Critical findings on the activation cascade of yeast plasma membrane H⁺-ATPase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p. 175-180, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.

LAM, S. K.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v. 16, p.172–180, 2009.

LEAB, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, I.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1564-1573, 1991.

LEE, C. K.; SHIBATA, Y.; RAO, B.; STRAHL, B. D.; LIEB, J. D. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. **Nature Genetic**, v. 36, p. 900–905, 2004.

LEE, O. S.; LEE B.; PARK, N.; KOO, J. C.; KIM, Y. H.; PRASAD, D. T.; KARIGAR, C.; CHUN, H. J.; JEONG, B. R.; KIM, D. H.; NAM, J.; YUN, J.-G.; KWAK, S.-S.; CHO, M. J.; YUN, D.-J Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicum esculentum*. **Phytochemistry**, v. 62 (7), p. 1073-1079, 2003.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, p. 707-719, 2007.

LIENER, I. E. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 183-188, 1951.

LIPKA, V.; PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 625-631, 2005.

LIS, M.; LIU, T. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D.; BOBEK, L. A. Antimicrobial peptide MUC7 12-mer activates the calcium/calcineurin pathway in *Candida albicans*. **FEMS yeast research**, v.1, p. 1-8, 2008.

LOCKHART, D. J.; DONG, H.; BYRNE, M. C.; FOLLETTIE, M. T.; GALLO, M. V.; CHEE, M. S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E. L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 1675-1680, 1996.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MACIEJ, L.; LIU, T. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D.; BOBEK, L. A. Antimicrobial peptide MUC7 12-mer activates the calcium/calcineurin pathway in *Candida albicans*. **FMES Yeast Research**, v. 10 (5), p. 579-586, 2010.

MASON, H. S.; MULLET, J. E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **Plant Cell**, v. 2, p. 569-579, 1990.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, p. 936-942.1998.

MCCONN, M.; CREELMAN, R. A.; BELL, E.; MULLET, J. E.; BROWSE, J. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5473–5477, 1997.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-639, 2005.

MENEGASSI, A.; WASSERMANN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D.; BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; FEDER, V.; CARLINI, C. R. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56 (12), p. 4399–4405, 2008.

MENEZES, H.; JARED, C. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 1-7, 2002.

MONK, B. C.; PERLIN, D. S. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Reviews Microbiology**, v. 20, p. 209-223, 1994.

MOONEY, B. P.; KRISHNAN, H. B.; THELEN, J. J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. **Phytochemistry**, v. 65 (12), p. 1733-1744, 2004.

MORAIS, J. K. S. **Aspectos estruturais da toxina da soja (SBTX) e sua participação na defesa vegetal**, 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MORAIS, J. K. S.; GOMES, V. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, I. S., DA CUNHA, M.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, H. P.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Soybean toxin (SBTX), a protein from soybeans that inhibits the life cycle of plant and human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, XXXX, XXX, 000–000, 2010. DOI:10.1021/jf101688k

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, v. 25 (7), p. 1215-1222, 2004.

NG, T. B.; PARKASH, A. Hispin, a novel ribosome inactivating protein with antifungal activity from hairy melon seeds. **Protein Expression and Purification**, v. 26 (2), p. 211-217, 2002.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74 (2), 366-371, 2007.

NIELSEN, J. Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. **FEBS Letters**. v. 583, p. 3905-3913, 2009.

OARD, S.; ENRIGHT, F. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 561– 572, 2006.

OLIVEIRA, H. D. **Toxinas protéicas de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]: aspectos moleculares e funcionais**. 2009. 179f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OSBORN, R. W.; DE SAMBLANX, G. W.; THEVISSSEN, K.; GODERIS, I.; TORRENKENS, S.; VAN LOUVEN, F.; ATTENBOROUGER, S.; RESS, S. B.; BROEKAERT, W. F. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Letters**., v. 368, p.257-262,1995.

PAPOUTSI, M.; DUDAS, J.; BECKER, J.; TRIPODI, M.; OPITZ, L.; RAMADORI, G.; WILTING, G. Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts. **Cell Tissue Research**, v. 330, p. 209–220, 2007.

PARK, C. J.; SHIN, R.; PARK, J. M.; LEE, G. J.; YOO, T. H.; PAEK, K. H. A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. **Molecular Cells**, v.11, p. 122–127, 2001.

PARK, C.; LEE, D. G. Fungicidal effect of antimicrobial peptide arenicin-1. **Biochimistry Biophysic Acta**, v. 1788, p. 1790-1796, 2009.

PARK, S. C.; LEE, J. R.; KIM, J. Y; HWANG, I.; NAH, J. W.; CHEONG, H.; PARK, Y.; HAHM, K. S. Pr-1, a novel antifungal protein from pumpkin rinds. **Biotechnology Letters**, v. 32, p.125-130, 2010.

PARK, S-C.; LEE, J. R.; SHIN, S-O, J. H., JUNG, Y., LEE, J. M., SON, H., PARK, Y.; LEE, S. Y.; HAHM, K-S. Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 (13), p. 5277–5281, 2007.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosadas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22 (2), p. 130-135, 2002.

PARSONS, C. M.; ZHANG, V. Digestibility of amino acids in high-lysine soybean meal. **Poultry Science**, v. 78 (1), p. 85, 1997.

PELEGRINI, P. B., NORONHA, E. F., MUNIZ, M. A. R., VASCONCELOS, I. M., CHIARELLO, M. D., OLIVEIRA, J. T. A., FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S-albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764 (6), p. 1141-1146, 2006.

PELEGRINI, P. B.; FARIAS, L. R.; SAUDE, A. C.; COSTA, F. T.; BLOCH, C.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, A. S.; GOMES, C. E.; SALES, M. P.; FRANCO, O. L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. **Current Microbiology**, v. 59, p. 400-404, 2009.

PICKETT, J. A., BIRKETT, M. A., BRUCE, T. J. A., CHAMBERLAIN, K., GORDON-WEEKS, R., MATTHES, M. C., NAPIER, J. A., SMART, L. E., WOODCOCK, C. M. Developments in aspects of ecological phytochemistry: "The role of cis-jasmone in inducible defence systems in plants". **Phytochemistry**, v. 68, p. 2937–2945, 2007.

PRADO, F.; AGUILERA, A. Partial depletion of histone H4 increases homologous recombination-mediated genetic instability. *Molecular Cell Biology*, v.25, p. 1526–1536, 2005.

PRASAD, D. B.; JHA, S.; CHATTOO, B. Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Plant science**, v.175, p. 364–371, 2008.

RAMAGE, G, SAVILLE, S. P., WICKES, B. L., LÓPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68 (11), p. 5459-5463, 2002.

REYMOND, P., WEBER, H., DAMOND, M., FARMER, E. E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 12, p. 707–719, 2000.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v. 17, p. 208–212, 1963.

RIBEIRO, S. F. F.; AGIZZI, A. P.; MACHADO, O. L. T.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; OLIVEIRA, M. A.; FERNANDES, K. V. S.; CARVALHO, A. O.; PERALES, J.; GOMES, V. M.; ROBERT-SEILANIANTZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J. D. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 372–379, 2007.

RODRIGUES, M. A. T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura da soja**. 198f. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Produção Vegetal e Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ROSSINI, M. C.; IRIGON, D. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; VERNETTI, F. J. Caracterização de 26 cultivares de soja [*Glycine max* (L.) merrill] recomendadas para a região sul – Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, 2, p. 227-235, 1995.

ROWHANI, A.; FALK, B. W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Methods to certify pathogen (Virus)-free plants. In: GAMBORG, O. L.; PHILIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1995.

ROY, K. W.; BAIRD, R. E.; ABNEY T. S. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in north America, with methods and a key for identification of selected fungi. **Mycopathologia**, v. 150, p.15–27, 2000.

SABINA, J.; BROWN, V. Glucose Sensing Network in *Candida albicans*: a Sweet Spot for Fungal Morphogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 8 (9), p. 1314-1320, 2009.

SALES, H. O. **Papel da lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia* R. et Schult. Na toxicidade a animais e seu envolvimento no mecanismo de defesa da planta**. 2008. 127f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SAMBETH, W.; NESHEIM, M. C.; SERAFIN, J. A. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. **Journal of Nutrition**, v. 92 (4), p. 479, 1967.

SAMOTO, M.; FUKUDA, Y.; TAKAHASHI, K.; TABUCHI, K.; HIEMORI, M.; TSUJI, H.; OGAWA, T.; KAWAMURA, Y. Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K, and the α -subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61 (12), p. 2148-2150, 1997.

SANTOS, P. H. A.; SANTOS, I. S.; MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, O. A.; GOMES, V. M. Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32 (3), p. 597-603, 2010.

SCHMUTZ, J.; SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, J. T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X-C; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, p. 178-183, 2010.

SCHRÖTER, C.; HIPLER, U. C.; WILMER, A.; KUNKEL, W.; WOLLINA, U. Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. **Archives of Dermatological Research**, v. 292, p. 260–264, 2000.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SELS, J.; MATHYS, K. J.; DE CONINCK, B. M. A.; CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M.F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides, **Plant Physiology Biochemistry**, v. 46, p. 941–950, 2008.

SERELS, S.; DAY, N. S.; WEN, Y. P.; GIRALDI, A.; LEE, S. W.; MELMAN, A.; CHRIST, G. J. Molecular studies of Human connexin 43 (Cx43) expression in isolated corporal smooth muscle cells. **International Journal Impotence Research**, v. 10, p. 135-143, 1998.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 61-94, 1989.

SEXTON, J. A.; BROWN, V.; JOHNSTON, M. Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. **Yeast**, v. 24, p. 847-860, 2007.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. History of soybeans and soyfoods in South america (1882-2009): extensively annotated bibliography and sourcebook. In **Soyinfo Center**, 2009, p. 6-625.

SIEBRA, E. A. **Toxina da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta**. 2004. 148f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SLUSARENKO, A. J.; FRASER, R. S. S.; VAN LOON, L. C. Mechanisms of resistance to plant diseases. In **Kluwer Academic Publisher**, p. 620. 2001.

STEARNS, R. L.; MARTINSKY, T.; SCHENA, M. Trends in microarray analysis. **Nature Medicine**, v. 9 (1), p.140-145, 2003.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; PRASAD, V.; WIEDEMANNMERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75 (8), p. 687-706, 1993.

STOUGHTON, B. R. Applications of DNA microarrays in biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 53–82, 2005.

STRASSNER, J.; SCHALLER, F.; FRICK, U. B.; HOWE, G. A.; WEILER, E. W., AMRHEIN, N.; MACHEROUX, P.; SCHALLER, A. Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. **Plant Journal**, v. 32, p. 585–601, 2002.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 45, p. 609-618, 2005.

TAVERNA, S. D.; LI, H.; RUTHENBURG, A. J.; ALLIS, C. D.; PATEL, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.14, p. 1025–1040, 2007.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 437-455, 2004.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R. G.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65 (12), p. 5451-5458, 1999.

THOMMA, B. P.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I. A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Plant Biology**, v. 95, p. 15107–15111, 1998.

TOBIAS, D. J.; MANOHARAN, M.; PRITSCH, C.; DAHLEEN, L. S. Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon). **Plant Cell Reports**. v. 26, p. 631– 639, 2007.

TORRES, M. A.; JONES, J. D.; DANGL J. L. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetic**. v. 37, p. 1130–1134, 2005.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4–30, 2000.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Moraís, J. K. Potencial Biotecnológico da Toxina da Soja...

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, (3), p. 183-193, 2010.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32 (3), p. 235-245, 2004.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; PITTO, L.; CASTIGLIONE, M. R.; GIORGETTI, L.; BRIGANTI, R.; BRACCI, T.; EVANGELISTA, M., NUTI, M. P., GIOVANNETTI, M. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 163, p. 393-403, 2004.

UNNIKRISHNAN, V.; NATH, B. S. Hazardous chemicals in foods. **Indian Journal of Dairy and Bioscience**, v. 11, p. 155-158, 2002.

VAN BELLE, D.; ANDRE, B. A genomic view of yeast membrane transporters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 389-398, 2001.

VAN DEN BERGH, K. P. B.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; COOSEMANS, J.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* (L.)). **FEBS Letters**, v. 530, p. 181-185, 2002.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 1-28, 2006.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T. H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Report**, v. 12, p. 245-264, 1994.

VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, J. K. S.; SIEBRA, E. A.; CARLINI, C. R.; SOUSA, D. O. B.; BELTRAMINI, L. M.; MELO, V. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, v. 51, p. 952-963, 2008.

VASCONCELOS, I. M.; TRENTIM, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 312, p. 357-366, 1994.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v. 189, p. 60-69, 1993.

VYLKOVA, S.; JANG, W. S.; LI, W.; NAYYAR, N.; EDGERTON, M. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. **Eukaryotic cell**, v. 6 (10), p. 1876–1888, 2007.

WAGNER, A. M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. **FEBS Letters**, v. 368, p. 339-342, 1995.

WANG, H. X.; NG, T. B. An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. Arvense. **Peptides**, v. 27 (7), p. 1732-1737, 2006a.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 342, p. 349-353, 2006b.

WANG, H. X.; NG, T. B. Isolation of a novel deoxyribonuclease with antifungal activity from *Asparagus officinalis* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p.120–124, 2001.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.72, p.165-221, 2002.

WEI, Q.; GUAN, Y.; CHENG, L.; RADINSKY, R.; BAR-ELI, M.; TSAN, R.; LI, L.; LEGERSKI, R. J. Expression of five selected human mismatch repair genes simultaneously detected in normal and cancer cell lines by a nonradioactive multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. **Pathobiology**, v.65, p. 293-300, 1997.

WORKMAN, J. L. Nucleosome displacement in transcription. **Genes**, v. 20, p. 2009–2017, 2006.

XIA, L.; NG, T. B. An antifungal protein from flageolet beans. **Peptides**, v. 26 (12), p. 2397-2403, 2005.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 1-10, 2002.

YE, X. Y.; NG, T. B. Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, p. 1111-1115, 2000.

YE, X.; NG, T.B. Isolation and characterization of Juncin, an Antifungal protein from seeds of Japanese Takana (*Brassica juncea* Var. *integrifolia*), **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 57 (10), p. 4366–4371, 2009.

ZACCHI, L. F.; SELMECKI, A. M.; BERMAN, J.; DAVIS, D. A. Low dosage of histone H4 leads to growth defects and morphological changes in *Candida albicans*. **Plos one**, v. 5 (5), p. 1-11, 2010.

ZARAGOZA, A.; GANCEDO, J. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, 187-194, 2000.

ZARKADAS, M.; FRASER, W. S.; SALMINEN, J.; PONG, A. H. Common allergenic foods and their labelling in Canada - A Review. **Canadian Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 4 (3), p. 118-141, 1999.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v. 32, (12), e103, 2004.

ANEXOS

Soybean Toxin (SBTX), a Protein from Soybeans That Inhibits the Life Cycle of Plant and Human Pathogenic Fungi

JANNE KEILA S. MORAIS,[†] VALDIRENE M. GOMES,[§] JOSÉ TADEU A. OLIVEIRA,[†]
IZABELA S. SANTOS,[§] MAURA DA CUNHA,[§] HERMOGENES D. OLIVEIRA,[†]
HENRIQUE P. OLIVEIRA,[†] DANIELE O. B. SOUSA,[†] AND ILKA M. VASCONCELOS^{*,†}

[†]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, CEP 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil, and [§]Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Soybean toxin (SBTX) is a 44 kDa glycoprotein that is lethal to mice ($LD_{50} = 5.6$ mg/kg). This study reports the toxicity of SBTX on pathogenic fungi and yeasts and the mechanism of its action. SBTX inhibited spore germination of *Aspergillus niger* and *Penicillium herguei* and was toxic to *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, and *Saccharomyces cerevisiae*. In addition, SBTX hampered the growth of *C. albicans* and *K. marxianus* and inhibited the glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *S. cerevisiae*, suggesting that SBTX interferes with intracellular proton transport to the external medium. Moreover, SBTX caused cell-wall disruption, condensation/shrinkage of cytosol, pseudohyphae formation, and *P. membranifaciens* and *C. parapsilosis* cell death. SBTX is toxic to fungi at concentrations far below the dose lethal to mice and has potential in the design of new antifungal drugs or in the development of transgenic crops resistant to pathogens.

KEYWORDS: *Glycine max*; soybean; soybean toxin; antifungal protein; plant toxin

INTRODUCTION

Heterotrophic organisms depend directly or indirectly on plants that provide proteins, oils, carbohydrates, vitamins, and minerals for their growth. Consequently, plants are continuously threatened by these organisms, including predators and phytopathogens. To counteract this biotic pressure and survive, plants have developed complex defense mechanisms (1, 2). In fungal infection, plant resistance is achieved by both constitutive and inducible defense mechanisms. These involve physical barriers and chemical weapons such as proteins and other organic molecules that are synthesized prior to infection or during pathogen attack (3, 4).

In plants, a large number of antifungal proteins have been described and characterized (5–7). They usually act by inhibiting the synthesis of the fungal cell wall or disrupting cell wall structure and/or function (8). Others interact with the plasma membrane, leading to pore formation, fungal cell lysis, disruption of the efflux and uptake of cellular components, and changes in the membrane potential (9, 10). Moreover, they eventually cross the fungal cell wall and membrane and interact with potential fungal intracellular targets, resulting in cell death (11).

Antifungal proteins have been shown to be strong candidates for plant improvement programs through biotechnological approaches to prevent plant fungal diseases and hence massive economic losses (12). In addition, new antifungals could potentially treat fungal diseases that are resistant to commercial

drugs (13). To fully explore the potential use of these proteins as chemical weapons against fungi, it is essential to thoroughly understand their mechanisms of action.

Thus, our research group has systematically investigated the role of plant proteins in defense against pathogens. Recently, we have shown that soybean toxin (SBTX), a lethal protein to mice ($LD_{50} = 5.6$ mg/kg by intraperitoneal (ip) injection), inhibited the mycelial growth of *Cercospora sojae* (14). SBTX is a 44 kDa basic glycoprotein composed of two polypeptide chains (27 and 17 kDa) linked by a disulfide bond. In agreement with the proposed defensive role of SBTX, the NH_2 -terminal amino acid sequences of the 27 and 17 kDa subunits share high similarities to SC24, an abundant 24 kDa protein from soybean seed hull, and to cyclophilins, respectively, to which protective function was attributed (15–17).

To test the hypothesis that SBTX is an antifungal protein, its inhibitory activity on the conidial and mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, and *Penicillium herguei* was evaluated. Moreover, to assess the action of SBTX toward yeasts, some of which are pathogenic to humans, its ability to inhibit the cell growth of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Pichia membranifaciens* was tested. In addition, to gain better insights into the mechanisms by which this toxin acts on these organisms, its effects on the glucose-stimulated acidification of the external medium was assessed in *Saccharomyces cerevisiae*. Finally, plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations were analyzed in *C. parapsilosis* and *P. membranifaciens*.

*Corresponding author (phone + 55 85 3366 9822; fax + 55 85 3366 9789; e-mail invasco@ufc.br).

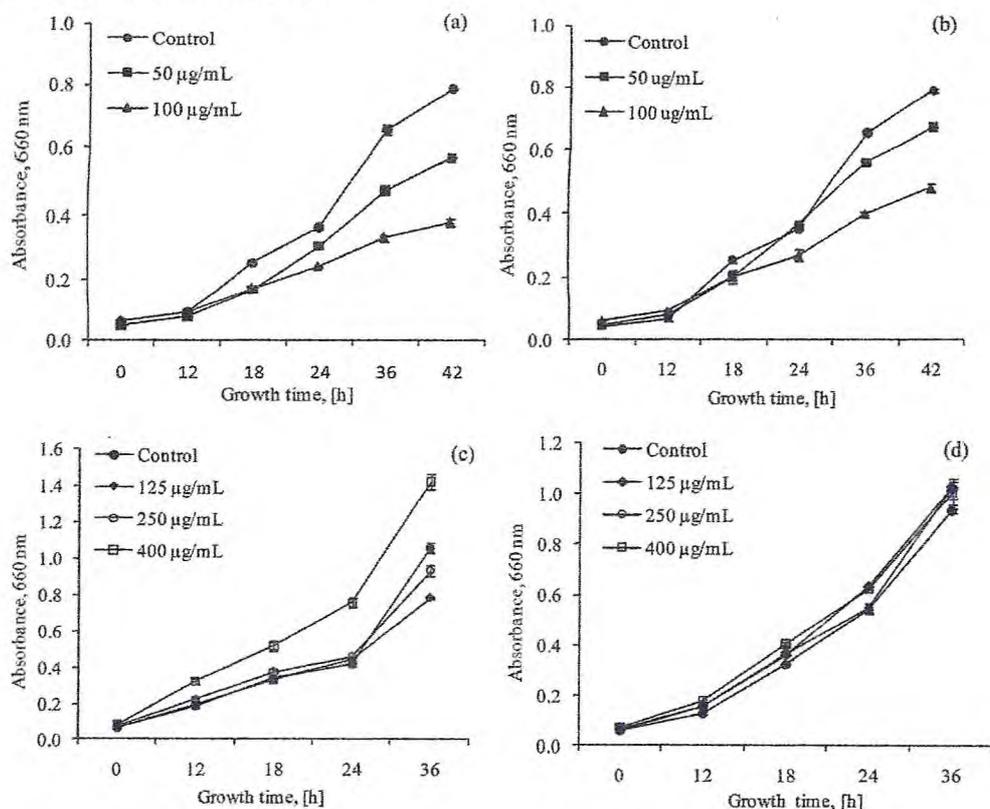


Figure 3. Growth curves of *Candida albicans* (A), *Kluyveromyces marxianus* (B), *Pichia membranifaciens* (C), and *Candida parapsilosis* (D) cells cultured in the absence and presence of soybean toxin (SBTX). Results are means \pm SD ($n = 3$).

plastic box maintained near 100% relative humidity at 22 °C in the dark for 16 h. After this time, 50 conidia were randomly selected from the treatments in the presence or absence of SBTX and evaluated for germination under an optical microscope. Pictures were taken with a digital camera (Sony, MCV-CD350 model, 3.2 megapixels). A conidium having germinating hyphae at least twice the length of the ungerminated conidium was considered to have successfully germinated. Assay for fungal growth inhibition was performed following the protocol developed by Broekaert et al. (24). Briefly, 100 μ L of the conidia suspension (2×10^4 /mL) was incubated in 96-well flat microplates (Nunc) with the same volume of SBTX (50 or 100 μ g/mL final concentration) prepared in 1% peptone dextrose broth, pH 6.0, and sterilized using a 0.22 μ m membrane (Millipore). Cell growth without the addition of SBTX was also determined. The fungal growth was monitored from 0 to 72 h by turbidimetry at 630 nm using an automated microplate reader (Bio-Tek Elx800). All experiments were run in triplicate. Statistical analysis to check whether the rates of fungal growth in the presence of SBTX depart significantly from the growth rate of controls was performed according to the method described by Johnston (25).

Effect of SBTX on Yeast Growth. Yeast cells (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, and *S. cerevisiae*) were obtained from inocula of each stock culture transferred to Petri dishes containing Sabouraud agar and allowed to grow at 28 °C for 2 days. Next, cells were transferred to sterile 0.15 M NaCl (10 mL) and counted in a Neubauer chamber to allow calculation of appropriate dilutions. Yeast growth inhibition was performed following the protocol developed by Broekaert et al. (24), with some modifications. Cells (10000 cells/mL of 0.15 M NaCl) were incubated at 28 °C in 200 μ L microplates in the presence of different concentrations of SBTX (50–400 μ g/mL). Cell growth was also determined without the addition of SBTX. Optical readings at 660 nm were taken at time zero and every 6 h for 36 or 42 h. At the end of this period, control and SBTX-treated cells were pelleted by centrifugation, washed in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, and observed in an optical microscope. All experiments were carried out in triplicate.

SYTOX Green Uptake Assay. Plasma membrane permeabilization was measured by SYTOX Green uptake, as described previously by

Thevissen et al. (26), with some modifications. *P. membranifaciens* and *C. parapsilosis* cells were cultured in the presence of SBTX (400 μ g/mL), as described previously. Cell suspensions (100 μ L) were incubated with 0.2 μ M SYTOX Green in 96-well microplates for 30 min at 25 °C under occasional agitation. Next, harvested cells were observed in a DIC microscope (Axiophoto Zeiss) set for fluorescein detection (excitation wavelengths, 450–490 nm; emission wavelength, 500 nm). Negative (no SBTX incubation) and positive (thermal treatment at 100 °C for 10 min) controls were also run to evaluate cell membrane permeabilization.

Inhibition of the Glucose-Stimulated Acidification of the Medium by Yeast Cells. This assay was carried out to assess whether SBTX had any effect on the ability of the cells *S. cerevisiae* to transport intracellular protons to the external medium. The assay was performed by measuring the pH of the external culture medium as previously described by Monk and Perlin (27). Briefly, *S. cerevisiae* cells were grown in Sabouraud broth for 16 h at 30 °C on a gyratory shaker at 160 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 3000g and 4 °C for 5 min and washed three times with 0.005 M Tris-HCl, pH 6.0; the pellet was resuspended in the Tris buffer at a cell density of 1.0×10^7 cells/mL. SBTX (4 mL at 400 μ g/mL) was added to 50 μ L of this cell suspension and incubated in an ice bath for 30 min with gentle stirring. After incubation, a 0.5 M glucose solution was added to a final concentration of 0.15 M, and the pH of the external medium was monitored for 60 min. Control experiments (BSA at 800 μ g/mL instead of SBTX or 0.005 M Tris-HCl, pH 6.0) were conducted in parallel to measure the extent of acidification of the external medium in the absence of SBTX. The variation in the proton (H^+) concentration was calculated on the basis of the difference of pH at 0 and 60 min.

Scanning Electron Microscopy (SEM). For SEM, yeast cells were grown for 36 h in Sabouraud broth in the presence (400 μ g/mL) or absence of SBTX. Cells were harvested and fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, for 30 min at room temperature (25 °C). Subsequently, the samples were rinsed three times with the above buffer, postfixed with 1.0% (m/v) osmium tetroxide diluted in the same buffer for 30 min at room temperature, and rinsed with distilled water. After this procedure, the fungi were dehydrated in acetone,

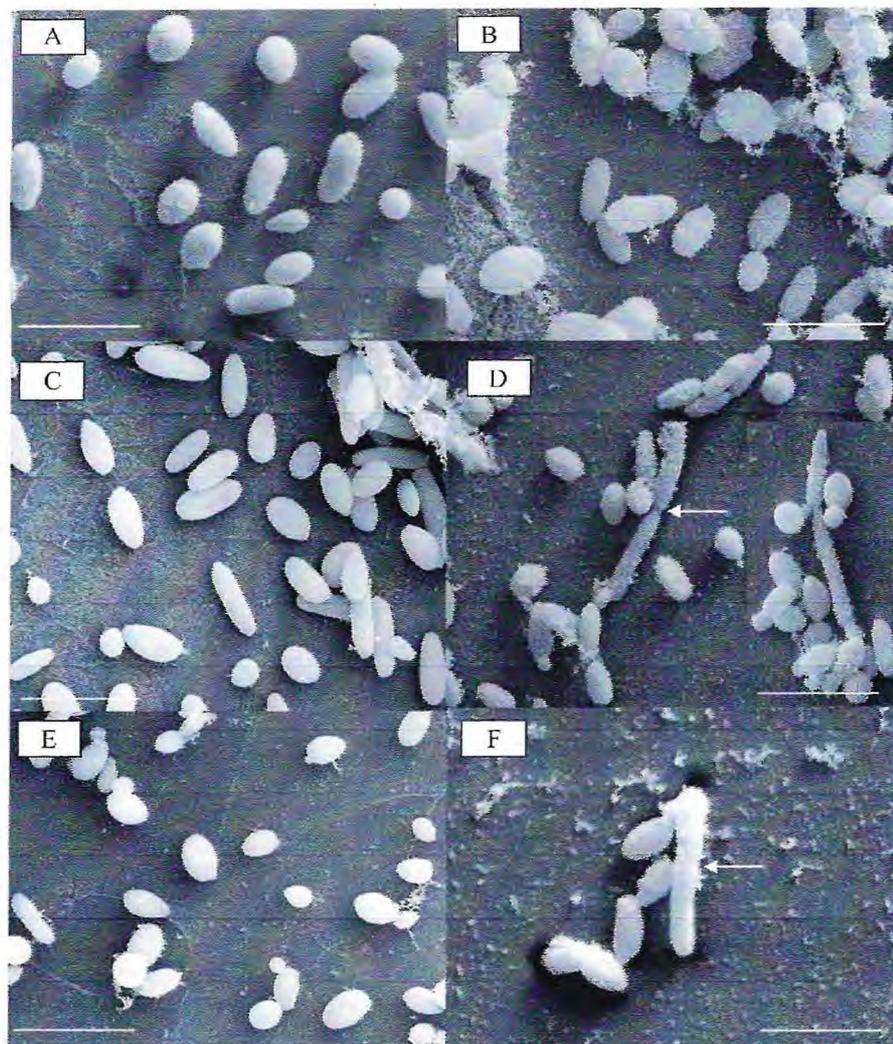


Figure 6. Scanning electron microscopy of yeast cells cultured in the absence (A, C, E) and presence (B, D, F) of soybean toxin (SBTX, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$): *Candida albicans* (A, B), *Pichia membranifaciens* (C, D), and *Candida parapsilosis* (E, F). Arrows point to a constriction between two cells, a characteristic of pseudohyphae. Bars (A–F): 10 μm .

and *P. herguei* might be due to differences in the cell wall chemical composition over the course of fungal development. The biological mechanism underlying the lack of inhibitory activity of SBTX toward *F. oxysporum* and *F. solani* is difficult to speculate particularly because of the scarcity of comparative studies on the structural constituents of cell walls of different fungi. However, the presence of β -1,6-glucan in addition to chitin and β -1,3-glucan, commonly found in filamentous fungi, contributing to the rigidity and integrity of the cell wall, and the presence of cell wall glycoproteins in the external layer of *F. oxysporum* (31) might have a bearing upon the resistance of *F. oxysporum* and *F. solani* to SBTX. Another possibility is that exposure of these fungi to SBTX might induce the cell wall integrity pathway that involves transcriptional activation of cell wall maintenance genes, as described by Jung and Levin (32).

Effect of SBTX on Yeast Growth. Many studies have focused on the antifungal activity of plant substances, but few have demonstrated their effects on the morphology and structure of fungi. Moreover, the mechanism of action is not well-understood. Thus, to assess the spectrum of action and mechanisms of inhibition of fungus development by SBTX, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, and *S. cerevisiae* were used as

model cells. Although a complete model of the cell wall of filamentous fungi is not available yet, many similarities exist in the cell walls of the above species of fungi (11).

SBTX at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibited the growth of *C. albicans* (54%) and *K. marxianus* (48%) within 42 h of incubation (Figure 3A, B). This inhibitory concentration of SBTX on the growth of both yeasts is 56 times less than that found to be lethal to mice and also lower than the amount found per gram of mature soybean seeds (300 $\mu\text{g}/\text{g}$) (14). In contrast, it was not inhibitory toward *P. membranifaciens* or *C. parapsilosis*, even at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 3C,D). In fact, for these species, increases in absorbance were observed when compared with controls, particularly for *P. membranifaciens* (Figure 3C). Moreover, in both cases, SBTX promoted morphological alterations characterized as pseudohyphae formation (Figure 4C,G), which was absent in control cells (Figure 4A,E). This morphological change could explain the increase in absorbances observed (Figure 3C,D). Interestingly, SBTX (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hampered the growth of *C. albicans* and *K. marxianus* but did not promote pseudohyphae formation in these cells (data not shown). Osborn et al. (33) showed that plant defensins isolated from different seeds cause morphological alterations that are often very distinct in some, but not all, tested

P. membranifaciens and *C. parapsilosis* cells incubated with SBTX was about 10 times higher than that of control cells.

Diz et al. (34) observed pseudohyphae formation in *C. albicans* cells in the presence of the F1 fraction (35 µg/mL) of chili pepper. Loss of asymmetry, deformations, clumps, and deep wrinkles in cells incubated with Pf2 (100 µg/mL), a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds, were reported in *S. cerevisiae* (13).

TEM of *P. membranifaciens* (Figure 7A–D) cells indicated that there was disruption of the cell wall in SBTX-treated cells (400 µg/mL) (Figure 7C,D). Moreover, condensation and shrinkage of heavily granulated cytosol, increased vacuolation, and loss of normal structure and content were observed when compared with control cells (Figure 7A,B). Structural disarrangement of the plasma membrane caused by the presence of SBTX was verified by SYTOX treatment (Figure 4D). Thus, these data together suggest that the antifungal properties of SBTX are triggered by alterations in the cell surface. No morphological modifications of *C. candida* in the presence of SBTX were observed by TEM (Figure 7E), similar to the results from SEM (Figure 6B).

In conclusion, this study reinforces previous data (14) on the antifungal properties of SBTX and reports new information about the molecular events that take place during pathogen–protein interaction. It is noteworthy that the toxic concentration found here for SBTX, a naturally occurring toxin which is inhibitory to phytopathogenic fungi and pathogenic yeasts, is far below that found to be lethal to mice. Therefore, SBTX has potential to be used for the development of new antifungal drugs or transgenic crops with enhanced resistance to pathogens.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Andre Lourenção, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), São Paulo, for providing the soybean seeds, genotype IAC-24.

LITERATURE CITED

- Barreto, A. L. H.; Vasconcelos, I. M.; Melo, V. M. M.; Matos, T. E.; Eloy, Y. R. G.; Fernandes, C. F.; Freire-Filho, F. R.; Oliveira, J. T. A. Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Int. J. Plant Sci.* **2007**, *168*, 193–203.
- Ye, X. Y.; Ng, T. B. Isolation and characterization of juncin, an antifungal protein from seeds of Japanese takana (*Brassica juncea* var. *integrifolia*). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4366–4371.
- Park, S.-C.; Lee, J. R.; Shin, S.-O.; Jung, J. H.; Lee, Y. M.; Son, H.; Park, Y.; Lee, S. Y.; Hahm, K. S. Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5277–5281.
- Lam, S. K.; Ng, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. *Phytochemistry* **2009**, *16*, 172–180.
- Melo, V. M. M.; Vasconcelos, I. M.; Gomes, V. M.; Da Cunha, M.; Soares, A. A.; Oliveira, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant Sci.* **2005**, *169*, 629–639.
- Yang, X.; Li, J.; Wang, X.; Fang, W.; Bidochka, M. J.; She, R.; Xiao, Y.; Pei, Y. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides* **2006**, *27*, 1726–1731.
- Santos, P. O.; Santos, I. S.; Gomes, V. M.; Machado, O. L. T.; Fernandes, K. V. S.; Xavier-Filho, J.; Oliveira, A. E. A. In vitro evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, *44*, 310–315.
- Selitreffnikoff, C. P. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2883–2894.
- Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*, 4–30.
- Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev.* **2005**, *3*, 238–250.
- Ferreira, R. B.; Monteiro, S.; Freitas, R.; Santos, C. N.; Zhenjia, C.; Batista, L. M.; Duarte, J.; Borges, A.; Teixeira, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 677–700.
- Lee, J. R.; Park, S.-C.; Kim, J.-Y.; Lee, S. S.; Park, Y.; Cheong, G.-W.; Hahm, K.-S.; Lee, S. Y. Molecular and functional characterization of a cyclophilin with antifungal activity from Chinese cabbage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 672–678.
- Agizzio, A. P.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Oliveira, M. A.; Ribeiro, S. F. F.; Gomes, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Sci.* **2006**, *171*, 515–522.
- Vasconcelos, I. M.; Morais, J. K. S.; Siebra, E. A.; Carlini, C. R.; Sousa, D. O. B.; Beltrami, L. M.; Melo, V. M. M.; Oliveira, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean (*Glycine max*) proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojae* growth. *Toxicon* **2008**, *51*, 952–963.
- Kan, Y.-C.; Liu, S.-W.; Guo, Z.-J.; Li, D.-B. Characterization of a cyclophilin cDNA from soybean cells. *Acta Bot. Sin.* **2002**, *44*, 173–176.
- Ye, X. Y.; Ng, T. B. Isolation of unguilin, a cyclophilin-like protein with anti-mitogenic, antiviral, and antifungal activities, from black-eyed pea. *J. Prot. Chem.* **2001**, *20*, 353–359.
- Dhaubhadel, S.; Kufli, K.; Romero, M. C.; Gijzen, M. A soybean seed protein with carboxylate-binding activity. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 2335–2344.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- Vasconcelos, I. M.; Trentin, A.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *312*, 357–366.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 685–689.
- Xue, L.; Charest, P. M.; Jabaji-Hare, S. H. Systematic induction of peroxidases, β -1,3-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* **1998**, *88*, 359–365.
- Boller, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanases. In *Molecular Plant Pathology*; Gurr, S. J., McPherson, M. J., Bowles, D. J., Eds.; IRL Press: New York, 1993; pp 23–29.
- Molano, J.; Durán, A.; Cabibi, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 648–656.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P.; Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *69*, 61–66.
- Johnston, J. Further topics in the k -variable linear model. In *Economics Methods*; Johnston, J., Ed.; McGraw-Hill: Singapore, 1987; pp 204–259.
- Thevissen, K.; Terras, F. R. G.; Broekaert, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5451–5458.
- Monk, B. C.; Perlin, D. S. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. *Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, *20*, 209–223.
- Araújo-Filho, J. H.; Vasconcelos, I. M.; Martins-Miranda, A. S.; Gondim, D. M. F.; Oliveira, J. T. A. A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4090–4096.
- Chadha, P.; Das, R. H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta* **2006**, *225*, 213–222.
- Feofilova, E. P.; Nemtsev, D. V.; Tereshina, V. M.; Memorskaya, A. S. Developmental change of the composition and content of the

This is to certify that

Ms. Janne Keila Sousa-Morais

Universidade Federal do Ceará, Brazil & Georg-August Universität Göttingen, Germany

was awarded

the prize of 250 US\$ for the 2nd best poster

within the poster presentation at the Symposium „Networking and Technology Transfer“, held in Bangkok, Thailand, from 7-12 June 2010. The title of the poster was *Soybean Toxin and its Activity against Pathogenic Yeasts.*



Prof. Dr. Rainer Jonas

Coordinator of the Scientific Evaluation Committee



inVent

Organizing International
Networking



2010-11-11 10:11:11
Dr. Dag Red Cross Society



HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG



eppendorf

In touch with life