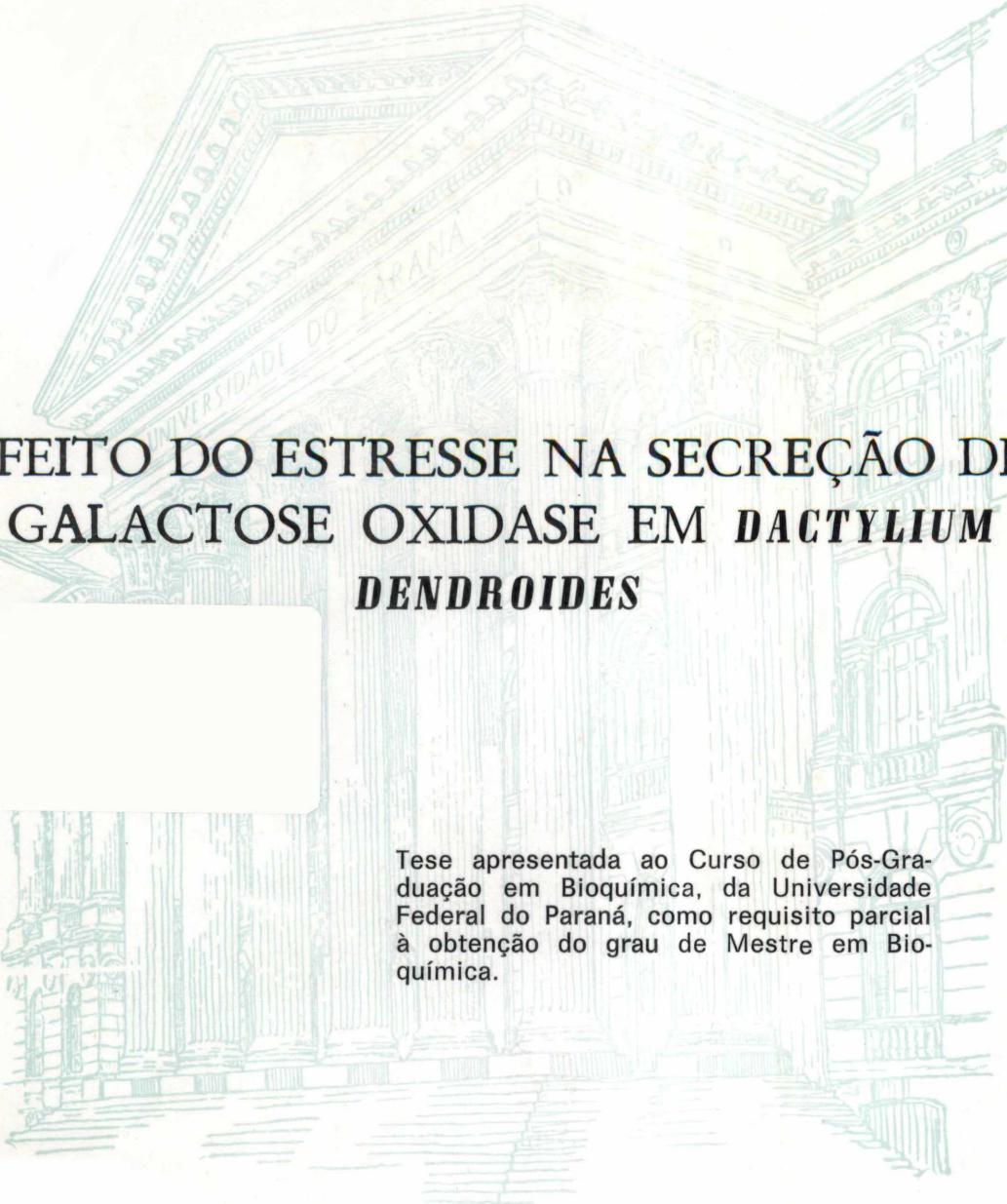


MARECI MENDES



EFEITO DO ESTRESSE NA SECREÇÃO DE GALACTOSE OXIDASE EM *DACTYLIUM* *DENDROIDES*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1996

MARECI MENDES

**EFEITO DO ESTRESSE NA SECREÇÃO DE
GALACTOSE OXIDASE EM *DACTYLIUM
DENDROIDES***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1996

MARECI MENDES

**EFEITO DO ESTRESSE NA SECREÇÃO DE GALACTOSE
OXIDASE EM *DACTYLIUM DENDROIDES***

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaci Therezinha Zancan

Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof^a. Dr^a. Déa F. do Amaral

Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu

Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 16 de dezembro de 1996

Tese orientada pela

Dr^a GLACI THEREZINHA ZANCAN

À DEUS

pela infinita bondade

Aos meus pais e irmão

pela dedicação, amor e paciência

AGRADECIMENTOS

À Drª. Glaci Therezinha Zancan, pelo aprendizado, orientação segura e dedicação com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho;

à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo apoio e colaboração sempre demonstrados;

à CAPES pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento do trabalho;

a todos os professores do Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo de reativos e equipamentos;

à Drª. Leda s. Chubatsu pelas sugestões recebidas e auxílio no preparo das eletroforeses;

ao Dr. Hidevaldo Machado e doutoranda Iara M. machado, pelo auxílio nos trabalhos fotográficos, pela atenção e amizade;

ao Dr. Gilvan Wosiacki pelo carinho e apoio ao meu ingresso no mestrado;

às mestrandas Carla C. Kanunfre e Clarice A. Osaku, companheiras de laboratório, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento dos trabalhos;

ao Carlos A. de Almeida, meu noivo, pela paciência e compreensão de minha ausência durante o desenvolvimento desta tese;

aos amigos Selene Elígio, Sílvia Malucelli, Tânia Bonfim, Tânia Bresolin, Fabiana Mansani, Paulo Fávero e Sandro Germano pela solidariedade, companheirismo e gentileza;

à Roseli Prado pelo carinho e assistência técnica no laboratório;

à equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela colaboração prestada;

a todos os colegas e funcionários de Departamento de Bioquímica pela atenção e pelo apoio;

à minha família pelo incentivo e compreensão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. MICRORGANISMO	15
2.2. REAGENTES	15
2.3. MEIOS DE CULTURA.....	16
2.3.1. MEIO SÓLIDO ÁGAR-MALTE	16
2.3.2. MEIO SÓLIDO ÁGAR SABOURAUD DOM SORBOSE 10mM	17
2.3.3. MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO (MEIO DE MARKUS).....	18
2.3.4. MEIO MÍNIMO DE MARKUS.....	19
2.4. CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DO MICRORGANISMO	19
2.5. PREPARO DO INÓCULO	19
2.6. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	20
2.7. PREPARO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	20
2.8. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO MICRORGANISMO	22
2.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTOSE OXIDASE	23
2.9.1. UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA	24

2.10.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	24
2.11.	DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE.....	24
2.12.	PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.....	25
2.13.	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS	25
2.14.	“IMMUNOBLOTTING” (“Westen blotting”)	26
2.15.	PREPARO DOS ESTRESSES.....	27
2.15.1.	ESTRESSE TÉRMICO.....	28
2.15.2.	ESTRESSE OXIDATIVO.....	28
2.15.3.	ESTRESSE ETANÓLICO.....	29
2.16.	PREPARO DO ESTRESSE TÉRMICO EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA.....	29
2.17.	PREPARO DO ESTRESSE OXIDATIVO E TRATADO COM L-[³⁵S]- METIONINA	30
3.	RESULTADOS.....	31
3.1.	PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	32
3.1.1.	CRESCIMENTO DE <i>Dactylium dendroides</i>.....	32
3.1.2.	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	32
3.1.3.	DETERMINAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	34
3.1.4.	CONSUMO DE GLUCOSE	34
3.2.	EFEITOS DO ESTRESSE ETANÓLICO SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE.....	37
3.2.1.	GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR	37
3.2.2.	GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR	37

3.3.	PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES SUBMETIDAS AO ESTRESSE ETANÓLICO	40
3.4.	DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE ETANÓLICO	40
3.5.	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A VIABILIDADE DO MICRORGANISMO.....	43
3.6.	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO A 45ºC SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE.....	45
3.6.1.	GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR	45
3.6.2.	GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR	45
3.7.	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO A 40ºC SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE.....	48
3.7.1.	GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR	48
3.7.2.	GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR	49
3.8.	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO A 40ºC SOBRE OS NÍVEIS DA ENZIMA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA	51
3.9.	PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES SUBMETIDAS AO CHOQUE TÉRMICO DE 40ºC.....	53
3.10.	DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE TÉRMICO	53
3.11.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A VIABILIDADE DO MICRORGANISMO	56

3.12. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE.....	58
3.12.1. GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR	58
3.12.2. GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR	58
3.13. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES EXPOSTAS A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	61
3.14. DETECÇÃO DOS NÍVEIS GALACTOSE OXIDASE POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE OXIDATIVO	61
3.15. AUTORADIOGRAFIA DE PROTEÍNAS SUBMETIDAS A ESTRESSE OXIDATIVO.....	64
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

I	CONSUMO % DE GLUCOSE APÓS O FUNGO SER SUBMETIDO AO ESTRESSE ETANÓLICO	36
II	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO A 40°C SOBRE OS NÍVEIS DA ENZIMA GALACTOSE OXIDASE EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA.....	52

LISTA DE FIGURAS

1.	Curva de crescimento de <i>Dactylium dendroides</i>	21
2.	Curva de padronização do inóculo.....	33
3.	Curva para determinação das unidades formadoras de colônias.....	35
4.	Efeito do estresse etanólico sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	38
5.	Efeito do estresse etanólico sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	39
6.	Perfil eletroforético das proteínas intracelulares e submetidas ao estresse etanólico	41
7.	“Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse etanólico	42
8.	Efeito da temperatura sobre a viabilidade de <i>Dactylium dendroides</i>	44
9.	Efeito do estresse térmico a 45°C sobre os níveis de galactose oxidase extracelular	46
10.	Efeito do estresse térmico a 45°C sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	47
11.	Efeito do estresse térmico a 40°C sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	49
12.	Efeito do estresse térmico a 40°C sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	50

13.	Perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao choque térmico de 40°C.....	54
14.	“Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse térmico	55
15.	Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade de <i>Dactylium dendroides</i>	57
16.	Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	59
17.	Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em <i>Dactylium dendroides</i>	60
18.	Perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao estresse oxidativo	62
19.	“Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse oxidativo.....	63
20.	Autoradiografia das proteínas intracelulares submetidas ao estresse oxidativo	65

RESUMO

O fungo *Dactylium dendroides* foi submetido aos estresse etanólico, térmico e oxidativo. Quando exposto por 8 horas a 2,0% (p/v) de etanol teve perda de 63% da atividade enzimática extracelular de galactose oxidase e, de 37% da atividade enzimática intracelular, esta observação confirmada pela reação com anticorpos específicos, demonstrando diminuição no teor da enzima. O fungo perdeu 85% de sua viabilidade quando submetido 10 minutos à 45°C, enquanto que um decréscimo de 5°C aumentou a viabilidade para 35%, indicando ser a temperatura de 40°C menos drástica para sua sobrevivência. A exposição do fungo a temperaturas de 40 e 45°C provocaram um aumento na atividade específica da galactose oxidase extracelular, a galactose oxidase intracelular também teve sua atividade enzimática elevada, o que foi comprovado pela detecção da enzima com anticorpos específicos. A cultura foi tratada com cicloheximida, um inibidor de síntese proteica, e não foi observada alteração das atividades extra e intracelular. Quando o fungo foi exposto a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, sua viabilidade decresceu 50% no tratamento com 1 mM de H₂O₂, e foi observado um aumento na atividade enzimática extra e intracelular no tratamento com 4mM de água oxigenada. A variação nos níveis da enzima intracelular foi confirmada pela reatividade com anticorpos específicos.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos, bactérias, fungos, plantas e animais, respondem a alterações do meio ambiente com indução de síntese de proteínas, que protegem as células de mudanças letais devido ao estresse (WATSON, 1990).

Estas proteínas têm sido de um modo geral, chamadas de proteínas do estresse ou *heat-shock proteins* - *hsp*. Este termo é utilizado não apenas quando a célula recebe um choque térmico, mas também quando é exposta a outro tipo de estresse, como por etanol, metais pesados, agentes oxidativos e anaerobiose (LINDQUIST e CRAIG, 1988).

As *hsp* compreendem três grupos principais que variam de 85-110 kDa, 60-80 kDa e <50kDa. As proteínas induzidas por estresse podem ser referidas como *hsp70*, *hsp26*, etc. , onde o número refere-se a massa molecular estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio - SDS-PAGE (WATSON, 1990). Os genes e proteínas do choque térmico podem estar presentes nos organismos em condições normais das células, sem terem sido submetidas a estresse (LINDQUIST e CRAIG, 1988; HAEJUNG et al., 1991 e YURA et al., 1993).

Na literatura é observado um grande interesse em se estudar como os organismos respondem as variações ambientais, sendo descritos vários tipos de estresses (COLLINSON e DAWES, 1992; JAMIESON, 1992; VANBOGELEN et al., 1987; CHARY e NATVIG, 1989 e DAVIES et al., 1995).

A resposta ao calor com indução de *hsp*, que varia de organismo para organismo, é rápida e intensa, demonstrando ser uma reação de emergência. As

hsp têm função protetora para as células e existe uma correlação entre sua indução e indução à termotolerância (LINDQUIST e CRAIG, 1988). Termotolerância é o fenômeno observado quando as células adquirem resistência a temperaturas severas que normalmente seriam letais, por exposição prévia a uma temperatura elevada, mas não-letal. Os tratamentos que induzem a termotolerância também induzem a síntese de *hsp*, podendo-se assumir que estas proteínas participem da proteção celular em temperaturas extremas. O desenvolvimento de termotolerância como uma consequência de estresse térmico tem sido documentado em muitos organismos e sua correlação com a síntese de *hsp* é evidente em estudos com alguns sistemas (IIDA e IYAHARA, 1984). Ao se estudar o efeito do estresse térmico em *Myxococcus xanthus*, foi demonstrado que a expressão de *hsp* é dependente de temperatura, sendo sugerido que a pré-indução de síntese de *hsp* protege as células do *M. xanthus* de efeitos letais de elevadas temperaturas (NELSON e KILLEEN, 1986). Porém, existem trabalhos que contradizem essas evidências, em certos casos a termotolerância se desenvolve na ausência de síntese de *hsp* e, em outros, a síntese é insuficiente para produzir termotolerância (LINDQUIST e CRAIG, 1988).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a um estresse térmico induziram termotolerância tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. A tolerância foi estudada nas diferentes fases de crescimento, sendo que na fase estacionária as células foram mais resistentes ao calor do que na fase exponencial, e a sensibilidade ao estresse foi dependente da composição de lipídeos da membrana (STEELS et al., 1994).

Foi isolado de *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *hsp104* e após uma mutação por deleção foi reintroduzido na levedura. As células mutantes cresceram

semelhantemente (à 25°C) e também morreram na mesma proporção que as do tipo selvagem quando expostas diretamente a altas temperaturas (à 50°C), entretanto quando submetidas a um pré-tratamento pelo calor (à 37°C), as células mutantes não adquiriram termotolerância como as células do tipo selvagem. Demonstrando que um produto do gene *hsp104* é requerido para induzir a termotolerância (SANCHEZ e LINDQUIST, 1990).

Quando células de *Neurospora crassa* foram submetidas a mudança de temperatura de 28 para 48°C, foi observada a síntese de 9 proteínas com massas moleculares entre 25 e 91 kDa; as proteínas de 90, 80 e 70 kDa foram as que responderam com maior intensidade ao estresse, sendo demonstrado que a síntese das *hsp* foi rápida e ocorreu durante o choque térmico, não permanecendo elevadas após o estresse termal (KAPOOR, 1986); esta síntese é requerida para proteção das células contra *heat shock* e auxilia a adquirir termotolerância e resistência a outros estresse, como observado em *Saccharomyces cerevisiae* (McALISTER e FINKELSTEIN, 1980).

KAPOOR e LEWIS (1987b) confirmaram os dados obtidos por KAPOOR (1986) quando submeteram *Neurospora crassa* ao estresse térmico, e encontraram mais 2 proteínas, perfazendo um total de 11 polipeptídeos induzidos pelo calor. Destas proteínas as mais abundantes foram *hsp80* e *hsp70*, a *hsp90*, pela técnica empregada não foi detectada, a *hsp80* foi induzida também por etanol e pareceu ser a primeira a ser sintetizada sob condições de estresse (ROYCHOWDHURY e KAPOOR, 1988). Posteriormente, esta *hsp80* foi purificada e foi demonstrado ser uma glicoproteína, sendo a única *hsp* glicosilada encontrada em *Neurospora crassa*,

e esta modificação parece ter algum significado para a sua função biológica (ROYCHOWDHURY e KAPOOR, 1990).

Em *Neurospora crassa* a proteína *heat shock hsp70*, encontrada no extrato micelial submetido a um estresse térmico à 45°C por 60 minutos, foi purificada e parcialmente sequenciada, sendo então comparada com *hsp70* de outras espécies, apresentando homologia com *hsp71* de *Drosophila melanogaster* e menor homologia comparada com *Saccharomyces cerevisiae* (FRACELLA et al., 1993). O gene da família da *hsp70* de *Neurospora crassa* foi clonado e caracterizado, sendo designado como *hsps-1*, a proteína apresenta uma massa molecular calculada de 70.561 Da, exibindo uma sequência homologa com outras *hsp70* de eucariotos (KAPOOR et al., 1995).

KAPOOR e LEWIS (1987a) demonstraram que a atividade de peroxidase é induzida quando células de *Neurospora crassa* são submetidas a estresse térmico e tratamento com peróxido de hidrogênio. Foi demonstrado que há uma forte correlação entre a capacidade de agentes indutores de estresse aumentarem o nível de peroxidase intracelular e o desenvolvimento de termotolerância a temperaturas que normalmente seriam letais, indicando que a peroxidase é importante para a proteção contra um estresse térmico (KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988; KAPOOR et al., 1990).

A indução de altos níveis de peroxidase em *N.crassa* por agentes que conferem termotolerância é uma forte indicação da função de proteção desta enzima *in vivo*. Essas observações vão de encontro com a hipótese de que uma das consequências iniciais de hipertermia é um aumento no nível intracelular de O_2^- (PRIVALLE e FRIDOVICH, 1987). A superóxido dismutase compreende uma

atividade de conversão de O_2^- para H_2O_2 e como uma contribuição, é sugerida a ação da peroxidase na cadeia de eventos culminando com a aquisição de termotolerância (KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988). Em *Neurospora crassa*, o gene da peroxidase induzida por choque térmico (gene *hspp*) foi clonado e seu produto correspondeu a *hsp90* visualizada em eletroforese SDS-PAGE após o fungo ser exposto ao calor (MACHWE e KAPOOR, 1993).

Em eucariontes, três enzimas glicolíticas têm sido identificadas como proteínas de estresse: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enolase e fosfoglicerokinase (LINDQUIST e CRAIG, 1988). Em alguns casos, estas *hsp* estão em altas concentrações nas condições normais, mas aumentam quando expostas ao estresse.

O etanol tem demonstrado ter um efeito similar ao do calor, de estimular a síntese de específicas *hsp* controladas pelo gene *htpR* (NEIDHARDT et al., 1984).

MICHEL e STARKA (1986), estudando *Zymomonas mobilis*, observaram que um pré tratamento com etanol ou calor aumentava a resistência celular, ou seja, aumentava a tolerância do microrganismo aos estresses térmico e etanólico; os resultados obtidos indicaram a existência de uma resposta típica ao estresse térmico, sendo que ela poderia estar envolvida na indução do aumento de tolerância ao etanol pelas células do microrganismo. A tolerância ao etanol está correlacionada com a composição dos lipídeos da membrana (CAREY e INGRAM, 1983). Em *Zymomonas mobilis* a enzima álcool desidrogenase foi identificada como uma *hsp* induzida por exposição ao etanol e elevadas temperaturas (HAEJUNG et al., 1991).

Na presença de etanol, a sensibilidade de leveduras a inativação térmica é aumentada. Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* demostraram que, quando a concentração de etanol extracelular era aumentada, a temperatura máxima que a levedura poderia suportar era diminuída, sendo sugerido que os sítios que determinam a temperatura de crescimento máximo estão localizados na membrana celular e o etanol os afeta, fazendo com que o microrganismo fique mais sensível (INGRAN e BUTTKE, 1984).

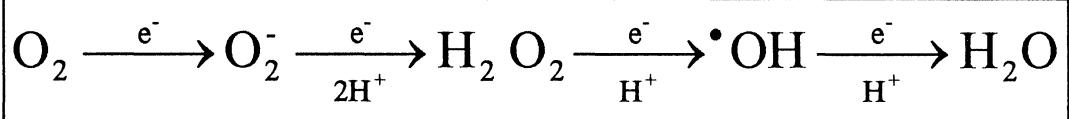
ROYCHOWDHURY e KAPOOR (1988) observaram que transferindo-se o micélio de *Neurospora crassa* para um meio suplementado com etanol e em uma temperatura de 28°C, foi estimulada a síntese de *hsp* 80. Ainda descreveram uma proteína que chamaram de *a/c* "80" (uma *hsp* distinta da *hsp* 80, com tamanho similar e ponto isoelétrico diferente), que foi induzida somente quando o micélio foi sujeito a dois tratamentos simultâneos; com etanol e calor.

MEYER et al. (1995), encontraram, em *Neurospora crassa*, uma proteína com massa molecular semelhante a de *a/c* "80", somente com adição de metanol, sem tratamento térmico, estes pesquisadores também estudaram a capacidade de álcoois alifáticos como metanol, etanol, propanol, butanol, entre outros, de induzir *hsp* e inibir a síntese de proteínas; os maiores níveis de *hsp* foram encontrados com concentrações de álcoois que inibiram a síntese de proteínas totais em mais de 50%. A capacidade dos diferentes álcoois em induzir resposta *heat shock* foi proporcional a sua lipofilicidade, concluindo então, que a indução de *hsp* por diferentes álcoois ocorre sob condições que apresentam efeitos citotóxicos.

Ao estudar-se o efeito do etanol no crescimento micelial de *Trichoderma reesei* foi determinado que este fungo é sensível a álcoois de cadeia curta, sendo que

concentrações acima de 2% de etanol inibiram sensivelmente o seu crescimento e, na presença de baixos níveis de etanol, a secreção de proteínas foi inibida mais fortemente que o crescimento micelial, sendo secretado somente um quarto das proteínas totais quando comparado com o desenvolvimento do fungo na ausência de etanol (MERIVUORI et al., 1987).

O estresse oxidativo tem sido estudado tanto em animais como em plantas. Todos os organismos aeróbicos utilizam o oxigênio como acceptor de elétrons. O oxigênio consumido é reduzido à água na cadeia de transporte de elétrons, numa reação que envolve a transferência de quatro elétrons para o oxigênio (FRIDOVICH, 1978), conforme mostrado abaixo:



Onde:

O_2^- - ânion radical superóxido

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

$\cdot\text{OH}$ - radical hidroxila

Os intermediários formados no processo são chamados de "espécies reativas de oxigênio" - ERO, e são deletérios ao organismo, podendo danificar membranas e assim comprometer a integridade celular (FARR et al., 1988); podem ainda oxidar

aminoácidos, danificar DNA, provocar mudanças no centro ativo de metaloenzimas, causar peroxidação de lipídeos e como agentes tóxicos, romperem as células (DEMIPLE, 1991). Para protegerem-se dos danos causados pelas ERO, os organismos aeróbicos têm desenvolvido mecanismos de defesa para seus componentes celulares (JAMIESON et al., 1994).

Tem sido estudada a resposta adaptativa ao estresse oxidativo em procariontes, principalmente *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Quando estas bactérias são expostas a uma baixa e não letal dose de oxidante adaptam-se e tornam-se resistentes a doses que se aplicadas diretamente sejam letais; essa resposta adaptativa requer a indução de síntese de proteínas (COLLINSON e DAWES, 1992; JAMIESON et al., 1996).

Para o esclarecimento da adaptação de fungos ao peróxido de hidrogênio, poucos estudos têm sido realizados (COLLINSON e DAWES, 1992; JAMIESON, 1992). Devido à flexibilidade genética e receptibilidade a manipulação por técnicas de biologia molecular, os fungos e leveduras representam excelente modelo para investigar o mecanismo básico de adaptação transitória ao H₂O₂ em eucariontes (DAVIES et al., 1995).

Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* sugerem que baixas concentrações de H₂O₂ induzem uma resposta adaptativa que protege as células de efeitos letais de altas concentrações (COLLINSON e DAWES, 1992; JAMIESON, 1992). Os genes YAP1 e YAP2 desempenham um papel importante regulando a indução da resposta adaptativa ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* (STEPHEN et al., 1995).

Para analisar o número de proteínas induzidas por estresse oxidativo, culturas de *Saccharomyces cerevisiae* em fase exponencial foram expostas a H₂O₂ (0,4 mM, 30 min) e então incubadas com L-[³⁵S]-metionina por 15 min; em seguida foi realizada uma eletroforese bi-dimensional e observada a síntese de 12 proteínas (JAMIESON et al., 1994).

STEELS et al. (1994) demonstraram que, ao submeter culturas de *S. cerevisiae* a baixas concentrações de H₂O₂ (0,1 mM, 60 min), foi induzida a tolerância a concentrações que seriam letais em condições normais (20 mM, 15 min), e a sensibilidade ao estresse oxidativo foi dependente da composição de lipídeos da membrana. A resposta das células ao estresse oxidativo em resistir a 20 mM de H₂O₂ também foi induzida com choque térmico (37°C, 30 min) em aerobiose, porém a exposição a baixas concentrações de H₂O₂ não induziu tolerância ao estresse térmico.

As células de *Saccharomyces cerevisiae* em crescimento exponencial são mais sensíveis a agentes oxidantes como H₂O₂ que as células na fase estacionária. O aumento da resistência ao estresse oxidativo em células de *S. cerevisiae*, pré-tratadas com baixas concentrações de H₂O₂ foi transitório, sendo revertido após 60-90 minutos de crescimento em ausência de H₂O₂. As células que eram tratadas novamente com H₂O₂ apresentavam resposta adaptativa transitória; para essa adaptação requeriam síntese de proteínas, propondo-se aumento da expressão de genes que codificam enzimas protetoras e reparo de enzimas (DAVIES et al., 1995).

Foi feito um estudo comparativo entre *Candida albicans* e *S. cerevisiae*, para determinar se na levedura patogênica, havia uma resposta protetora adaptativa ao estresse oxidativo similar a encontrada em *S. cerevisiae*. As culturas de *C. albicans*

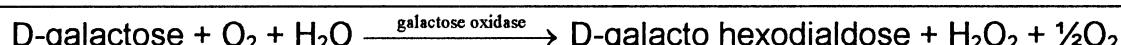
foram expostas a 0,4 mM de H₂O₂ e subsequentemente a doses maiores (até 100 mM), os resultados demonstraram que houve resposta adaptativa induzida ao peróxido de hidrogênio e que o nível de resistência ao agente oxidante foi maior para *C. albicans* que para *S. cerevisiae*. Foi ainda determinada a atividade de várias enzimas no extrato de *C. albicans* após as culturas serem tratadas com 0,4 mM de H₂O₂ por 1 hora, havendo um aumento de catalase, glutationa peroxidase e glucose 6-fosfato desidrogenase, quando comparado com extrato de cultura não submetido a estresse (JAMIESON et al., 1996).

A resposta a vários tipos de estresse tem sido intensamente estudada usando *E.coli* e *S.cerevisiae* como modelos de organismos procarióticos e eucarióticos, respectivamente, porém um grande número de outros microrganismos tem sido examinado nos últimos anos, incluindo o procarionte *Bacillus subtilis*, o protozoário *Tetrahymena pyriforms*, o fungo filamentoso *Neurospora crassa*, entre outros (WATSON, 1990).

Foi observado que em *Neurospora crassa*, a resposta ao choque térmico ocorreu com uma pronunciada indução de peroxidase (E.C.1.11.1.7), também induzida por H₂O₂, etanol, arseniato de sódio e cloreto de cádmio (KAPOOR e LEWIS, 1987b; KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988). Além disso, tratamentos conduzidos para o desenvolvimento da atividade de peroxidase promoveram a aquisição de termotolerância, igualmente quando na ausência de choque térmico (MACHWE e KAPOOR, 1993). KAPOOR et al. (1990) propuseram que a indução do aumento da peroxidase poderia ser para contrabalancear os elevados níveis intracelulares de H₂O₂, desse modo protegendo as células contra danos em membranas ocasionados por peroxidação de lipídeos.

Pouco se conhece sobre o efeito do estresse sobre secreção de enzimas. Para estudar este efeito optou-se por estudar as variações da enzima galactose oxidase (GAO) produzida pelo fungo *Dactylium dendroides*.

A galactose oxidase foi descrita em 1959 por COOPER et al., e catalisa a oxidação da D-galactose na posição do C-6, com a formação da D-galactohexodialdose, reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (AVIGAD et al., 1962), conforme a reação abaixo:



Tem sido encontrado alguns microrganismos que apresentam a enzima galactose oxidase, como: *Dactylium dendroides* (COOPER et al., 1959; AMARAL et al., 1966; AVIGAD et al., 1962), *Gibberella fujikuroi*, *Aspergillus japonicum*, *Absidia butleri*, *Daedaleopsis styracina*, *Neurospora crassa*, *Penicillium notatum* (AISAKA e TERADA, 1981), entre outros. Mas, a enzima foi secretada em quantidades apreciáveis somente em *Dactylium dendroides* e *Gibberella fujikuroi*. Estudos posteriores demonstraram que a enzima do *G.fujikuroi* apresentava determinantes antigênicos distintos do *D.dendroides* (MIYAGUI, 1984).

A galactose oxidase é uma metaloenzima, com cobre ligado e a remoção deste íon resulta em uma apoenzima inativa, mas a atividade pode ser recuperada incubando-se a apoenzima com sais de cobre tanto na forma Cu(I) como Cu(II), mas não com outros metais; o cobre é essencial para a atividade enzimática (AMARAL et al., 1963). A galactose oxidase intracelular de *D.dendroides* foi caracterizada e purificada por MENDONÇA e ZANCAN (1987).

PEDROSA e ZANCAN em 1986 demonstram que há um aumento no nível de galactose oxidase quando o microrganismo *D.dendroides* é exposto a altas tensões de oxigênio (O_2). Foram determinadas as atividades de galactose oxidase, catalase e superóxido dismutase, a nível intracelular foi obtido um aumento de 10,4-2,3 e 2,1 vezes, respectivamente, parecendo ser a galactose oxidase melhor indicadora de concentrações de O_2 que a catalase e a superóxido dismutase. A galactose oxidase extracelular aumentou 77 vezes com 100% de oxigênio e as atividades de catalase e superóxido dismutase não foram detectadas no meio de cultura, assim sendo o aumento do nível da galactose oxidase extracelular pode sugerir que ela desempenha um papel de proteção para o *D.dendroides* contra o oxigênio e como uma função alternativa, poderia ter uma ação antimicrobiana.

Ao expor o micélio do *D. dendroides* ao etanol, foi observado o decréscimo no nível de atividade da galactose oxidase intra e extracelular, através da inibição das cadeias O-glicosídicas que aparentemente ao serem modificadas resultam na perda de estabilidade da enzima (MENDONÇA e ZANCAN, 1989).

O presente trabalho se propõe a analisar o comportamento do fungo *Dactylium dendroides* frente aos estresses etanólico, térmico e oxidativo e determinar os níveis de galactose oxidase intra e extracelular no fungo em condições estressantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho é o fungo *Dactylium dendroides*, isolado em Curitiba em 1955 e gentilmente cedido pela Dr^a Déa Amaral, ainda não tem posição taxonômica estabelecida (PEREIRA e ZANCAN, 1993) e está depositado no Northern Regional Research Laboratories sob o número NRRL 2903 e no American Type Culture Collection sob o número ATCC 46032.

2.2 REAGENTES

D-galactose foi adquirida da Calbiochem, fenol (destilado) e álcool etílico foram provenientes da E. Merck, peroxidase tipo horseradish, 4-aminoantipirina, o-dianisidina, PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride), cicloheximida, ³⁵S-metionina, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foram adquiridos da Sigma Chemical Company. O peróxido de hidrogênio foi proveniente da Labsynth. Os demais reagentes utilizados foram adquiridos de diversas fontes, todos pró-análise e considerados quimicamente puros. Foram utilizados como marcadores de pesos moleculares os padrões LMW (low molecular weight) da Pharmacia, constando de fosforilase b (94.000 Da); albumina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da); anidrase carbônica (30.000 Da); inibidor de tripsina (20.100 Da) e α -lactoalbumina (14.400 Da).

A concentração do peróxido de hidrogênio foi determinada a nm através de seu coeficiente de extinção de $39,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 240 nm (NELSON e KIESON, 1972) e pelos métodos de VOGEL (1951) e de COTTON e DUNFORD (1973).

A galactose oxidase intracelular utilizada como padrão foi preparada de acordo com MENDONÇA e ZANCAN (1987) e o anticorpo anti-galactose oxidase intracelular de acordo com a técnica estabelecida por MIYAGUI (1984), foram preparados e gentilmente cedidos pela Ms.Iara Maria Pereira, Departamento de Bioquímica da UFPR.

2.3 MEIOS DE CULTURA

2.3.1 MEIO SÓLIDO DE ÁGAR-MALTE

Para a manutenção da cepa do microrganismo foi utilizado este meio sólido com a seguinte composição:

glucose	20 g
peptona	1 g
extrato de malte	20 g
ágar	20 g
água q.s.p.	1000 ml

O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a pressão de 1 atmosfera, e em seguida os tubos foram inclinados.

2.3.2 MEIO SÓLIDO ÁGAR SABOURAUD COM SORBOSE 10 mM

Este meio foi utilizado para contagem de colônias, onde as culturas foram semeadas após submetidas aos estresses, o meio Sabouraud é composto por:

peptona	10 g
extrato de levedura	5 g
ágar	15 g
água qsp	1000 ml

O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a pressão de 1 atmosfera, sendo então acrescentada a sorbose e em seguida feito o plaqueamento. A sorbose foi utilizada como fonte de carbono e também para formação de colônias (TATUM et al., 1949), sendo esterilizada separadamente em vapor fluente durante 30 minutos e adicionada assepticamente ao meio de cultura de modo que a concentração final ficasse em 10mM.

2.3.3 MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO (MEIO DE MARKUS)

Em todos os experimentos, o NRRL 2903 foi cultivado em meio líquido de Markus (MARKUS et al, 1965), que tem a seguinte composição:

KH_2PO_4 anidro	9,0 g
Na_2HPO_4 anidro	8,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
NH_4NO_3	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH final do meio foi corrigido para 5,8 com ácido clorídrico 1:1(v/v). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro Micronal B 374.

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

A D-glucose, foi esterilizada separadamente em vapor fluente durante 30 minutos e adicionada assepticamente ao meio de cultura no momento de uso na concentração final de 1,0%.

2.3.4 MEIO MÍNIMO DE MARKUS

Para o preparo dos estresses, após o microrganismo ser cultivado em meio de Markus completo, o mesmo foi transferido para o meio Mínimo de Markus, que apresentava a mesma composição do meio de Markus completo, porém sem extrato de levedura, a D-glucose foi preparada como já descrito e adicionada no momento do uso de modo que a concentração final ficasse em 0,2%.

2.4 CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DO MICRORGANISMO

O microrganismo foi cultivado em meio ágar malte a 28°C por 72 horas ou até o desenvolvimento do micélio e estocado em geladeira à 4°C, fazendo-se transferências trimestrais.

2.5 PREPARO DO INÓCULO

Fragmentos de micélio cultivados em ágar malte foram transferidos assepticamente para um frasco erlenmeyer com capacidade de 250 ml, contendo 50 ml de meio líquido de Markus e D-glucose a 1%. O crescimento foi conduzido por 48 horas à 28°C com agitação contínua em agitador rotatório (New Brunswick Scientific Co) a 120 rotações por minuto (rpm). Após este período, uma alíquota do micélio (2%) era transferida para um erlenmeyer de 250 ml contendo 50ml do

mesmo meio, e o crescimento ocorria nas mesmas condições já descritas, porém pelo período de 24 horas.

2.6 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O crescimento do microrganismo foi efetuado em frascos erlenmeyer, com uma relação de 1:5 entre o volume do meio e do frasco. Esta relação foi mantida constante em todos os cultivos e experimentos realizados durante o trabalho.

O pré-inóculo foi homogeneizado a baixa velocidade em liquidificador Waring Blender por 30 segundos (3 vezes de 10 segundos) e então, inoculado em frascos com meio líquido de Markus, de modo que o inóculo ficasse na proporção de 2%.

2.7 PREPARO DA CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento (figura 1) foi efetuada em frascos erlenmeyers de 500 ml com 100 ml de meio líquido de Markus, sendo o experimento realizado em duplicata. Após o cultivo eram retirados frascos de 12 em 12 horas (até 72 horas), e os micélios das culturas coletados a vácuo sobre discos de papel qualitativo de peso conhecido. Os filtros com os micélios foram colocados em estufa à 105°C por 3 horas e então pesados de 1 em 1 hora até peso constante. O peso foi determinado em balança analítica após atingir a temperatura ambiente em dessecador, contendo sílica gel.

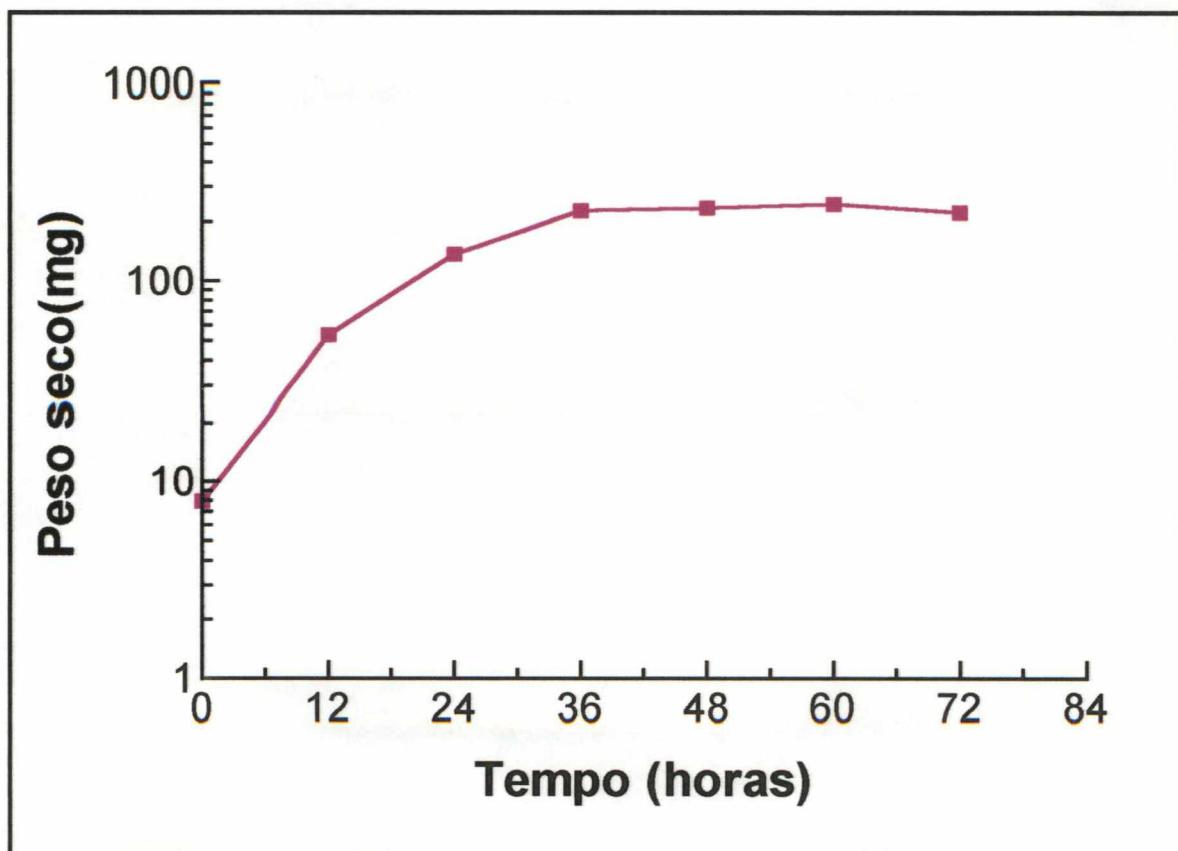


FIGURA 1 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides*

O micélio foi recolhido de 12 em 12 horas, em discos de papel qualitativo de peso conhecido, secado em estufa à 105°C por 3 horas e pesado de 1 em 1 hora até peso constante, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.7. Os valores numérico apresentados foram expressos em duplicata.

2.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO MICRORGANISMO

Para determinar a viabilidade do microrganismo após ser submetido aos diferentes estresses, as condições foram padronizadas, sendo considerado 100% de sobrevivência a cultura que não sofreu estresse. Após cultivo de 24 horas, a cultura foi homogeneizada em “waring blender” por 30 segundos (3 vezes de 10 segundos), foram feitas várias diluições que foram lidas em espectrofotômetro a 680 nm, e então coletadas à vácuo sobre discos de papel qualitativo de peso conhecido, estes micélios foram colocados em estufa até peso constante e pesados em balança analítica; com os resultados foi construída uma curva padrão, tendo na abscissa o peso seco dos micélios (mg/mL) e na ordenada as leituras de absorbância a 680 nm para cada diluição estabelecida. Estas diluições também foram semeadas em placas com meio Sabouraud e sorbose para contagem das unidades formadoras de colônias-UFC (TATUM et al., 1949), tendo-se desta forma outra curva padrão, que correlaciona a Absorbância em 680nm com o número de células viáveis em um determinado volume de cultura.

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GALACTOSE OXIDASE

A galactose oxidase catalisa a oxidação da D-galactose com a formação da D-galacto-hexodialdose, reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio. Então sua atividade pode ser determinada por dois métodos: pelo consumo de oxigênio ou pela formação de peróxido de hidrogênio. No presente trabalho optou-se em determinar pelo segundo método.

A dosagem de peróxido de hidrogênio foi determinada tanto na galactose oxidase extra como na intracelular pelo método enzimático acoplado proposto por AISAKA e TERADA (1981). A água oxigenada formada é decomposta em presença de peroxidase, acoplando oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, resultando num produto corado, a quinoneimina, que apresenta absorção máxima a 500nm (ALLAIN et al., 1974).

O sistema de incubação para um volume final de 1 ml era composto de 150 µmoles de tampão fosfato pH 7(Na^+/K^+), 200 µmoles de D-galactose, 0,48 µmoles de 4-aminoantipirina, 7,0 µmoles de fenol, 6,7 unidades de peroxidase e um volume variável de enzima. O sistema era incubado a 30°C e a reação iniciada com a adição do substrato D-galactose, sendo lida imediatamente a 500 nm em espectrofotômetro. A conversão de unidades de absorbância em η moles de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo emprego de uma curva padrão (10 a 280 nmoles de água oxigenada). Foram efetuados controles sem D-galactose e sem galactose oxidase e não foi observado em nenhum dos casos reação colorida.

2.9.1 UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA

Uma unidade (U) de galactose oxidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de H₂O₂ por minuto nas condições do ensaio e, a atividade específica, como a razão entre unidade de enzima e miligramas de proteína.

2.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi realizada pelo método proposto por LOWRY em 1951, utilizando como padrão soro albumina bovina. As amostras foram previamente dialisadas e quando necessário concentradas a baixas temperaturas em liofilizador (Heto Dry GD -I- CT 110).

2.11 DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE

A D-glucose utilizada como fonte de carbono, foi dosada no meio de cultivo após as culturas serem submetidas aos estresse, empregando-se o método da glucose-oxidase (DAHLQVIST, 1961).

2.12 PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Os micélios previamente congelados a -80°C foram macerados com areia (tratada com ácido nítrico e lavada exaustivamente até pH neutro), e homogeneizados em tampão fosfato 0,2M pH 7,0 (o volume de tampão foi 2 vezes o peso do micélio) com 2mM de PMSF (Phenyl methyl sulphonyl fluoride - inibidor de protease), sendo esta concentração determinada por ensaios prévios. Em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm com rotor JA 20, em centrífuga refrigerada à 4°C (Beckman - Modelo J 21-B) e dialisados por 3 horas, com trocas de água de 1 em 1 hora, para determinação de proteínas e preparo da eletroforese.

2.13 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS

Para a corrida eletroforética as amostras foram preparadas da seguinte maneira: o material foi liofilizado em eppendorff (com concentrações constantes de proteínas, preestabelecidas), ressuspenso em tampão fosfato pH 7,0 - 0,2M, tratado com 2% de SDS - dodecil sulfato de sódio) e 5 % de β -mercaptoetanol, e incubado em banho-maria fervente por 5 minutos, conforme o método de LAEMMLI (1970). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% juntamente com o marcador de corrida, que constava de azul de bromofenol 0,025% em 50% de glicerol. A corrida foi realizada em presença de tampão Tris-Glicina (25mM de Tris, 192mM de Glicina) pH8,3 e 2% de SDS, com voltagem constante de 200 V, por aproximadamente 1 hora em aparelho de eletroforese vertical MINI 8.10 da BRL. A

revelação das proteínas foi feita com Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% em metanol 30%), e a descoloração foi feita com uma solução de metanol, ácido acético glacial e água destilada na proporção 3:1:6.

2.14 “IMMUNOBLOTTING” (“Westen blotting”)

As proteínas após serem submetidas a eletroforese em gel 10% de poliacrilamida-SDS, foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose, de acordo com o método de BURNETTE (1981). Sendo a transferência realizada em tampão Tris-Glicina-Metanol (25mM de Tris, 192mM de glicina e 20% de metanol), utilizando uma amperagem constante de 50mA em aparelho de eletroforese vertical MINI 8.10 da BRL por aproximadamente 12 horas. Para a detecção da enzima foi utilizado um anticorpo policlonal contra galactose oxidase intracelular e, como anticorpo secundário, o anti-IgG conjugado com peroxidase. A membrana foi revelada com solução 0,02% de o-dianisidina e 0,015% de H₂O₂ em tampão acetato pH 5,6. A relação usada para a galactose oxidase e o anticorpo anti-galactose oxidase foi previamente padronizada, sendo fixada a concentração de enzima e preparadas diferentes diluições do anticorpo (1:250, 1:350, 1:500, 1:700 e 1:1000). Após ser estabelecida a melhor relação (1:500), esta foi mantida constante em todos os experimentos.

2.15 PREPARO DOS ESTRESSES

O micélio, na fase exponencial de crescimento foi coletado por filtração, lavado e transferido assepticamente para um frasco erlenmeyer de 2000 ml de capacidade com 600ml de Meio Mínimo de Markus, de modo que o micélio ficasse a 2.0% em peso úmido e em média 0,2% em peso seco. Após homogeneização este meio foi fracionado, transferindo-se 50 ml da cultura para erlenmeyers de 250ml de capacidade. As células foram então submetidas ao estresse, sendo o experimento realizado em duplicata, após o tratamento empregado, a cultura de um dos frascos foi homogeneizada em “waring blender” e diluída para leitura em espectrofotômetro a 680 nm e semeado em Meio Sabouraud com 10mM de sorbose para contagem de colônias. Do outro frasco de cada tratamento, a cultura foi filtrada a vácuo, e o micélio congelado em freezer a -80°C para serem confeccionados os extratos livres de células, nos quais foram determinadas a atividade de galactose oxidase intracelular e, após diálise, concentração de proteínas, o perfil eletroforético e a detecção da galactose oxidase com anticorpos específicos - “immunoblotting”. No filtrado foi imediatamente determinada a atividade de galactose oxidase extracelular e concentração de glucose residual, então foi dialisado e determinada a concentração de proteínas.

2.15.1 ESTRESSE TÉRMICO

O estresse térmico foi realizado nas temperaturas de 40°C e 45°C, as amostras foram retiradas nos seguintes tempos (0, 10, 20 30, 45 e 60 minutos), foram feitos controles a temperatura de 28°C, passado cada tempo estabelecido, os frascos foram imediatamente resfriados em banho de gelo, sendo todos os procedimentos adotados descritos no item 2.15.

2.15.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Foi efetuado conforme descrito no item 2.15, porém no momento da transferência da cultura para os frascos em que as células seriam submetidas ao estresse, foi adicionada concentrações diferentes de solução de peróxido de hidrogênio (0,5mM - 16mM), sendo os frascos mantidos em banho-maria com agitação a 28°C pelo período de 60 minutos. A água oxigenada utilizada era p.a. e sua concentração molar foi determinada através de seu coeficiente de extinção de $39,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 240 nm (NELSON e KIESON,1972). Foi realizado um controle sem adição de H_2O_2 . Antes de ser determinada a atividade de galactose oxidase extracelular foi feita a dosagem de água oxigenada residual pelos métodos de VOGEL (1951) e de COTTON E DUNFORD (1973), não sendo detectada H_2O_2 pelas técnicas empregadas, o meio foi então dialisado contra 0,1 mM de CuSO_4 , para retirar um possível excesso de água oxigenada e para determinar a atividade enzimática.

2.15.3. ESTRESSE ETANÓLICO

O estresse etanólico foi feito como descrito no item 2.15, e quando a cultura de células do meio mínimo foi transferida para os erlenmeyers de 250 ml, os mesmos foram acrescidos de 2.0% (p/v) de álcool etílico, sendo submetidos a agitação em banho-maria a 28°C retirados em intervalos de tempo de 0, 2, 4 e 8 horas, foram feitos para cada tempo, controles sem etanol. Os demais procedimentos estão apresentados no item 2.15.

2.16 PREPARO DO ESTRESSE TÉRMICO EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA

A cultura após cultivo de 24 horas foi filtrada e o micélio lavado e transferido para o Meio Mínimo de Markus, como descrito no item 2.15. O meio foi fracionado em erlenmeyers, com volume de 50 mL e, ao iniciar o estresse (tempo zero) foi adicionada uma solução de cicloheximida na concentração de 20 μ g/ml (CAVICHOLO e ZANCAN, 1988). A cicloheximida foi solubilizada em etanol na proporção de 1 mg de cicloheximida/0,5ml de etanol 95%. Para cada tratamento foram feitos controles sem cicloheximida, mas com adição da mesma quantidade em volume de etanol a 95%. As células foram então submetidas ao estresse a temperatura de 40°C, por 20 minutos, tendo-se controles a temperatura de 28°C. Passado o tempo estabelecido, a cultura foi filtrada e foram preparados os extratos livres de células, nos quais foram determinadas a atividade de galactose oxidase intracelular e, após diálise a concentração de proteínas; no filtrado foi determinada

a atividade de galactose oxidase extracelular e dosada a glucose residual, sendo então dialisado para determinar a concentração de proteínas.

2.17 PREPARO DO ESTRESSE OXIDATIVO E INCUBAÇÃO COM L-[³⁵S]-METIONINA

O microrganismo foi cultivado por 24 horas em meio de Markus, em seguida foi filtrado, lavado e transferido para o Meio Mínimo de Markus, de onde foi fracionado em volumes de 10 ml para erlenmeyers com capacidade para 50 ml. As culturas foram submetidas a estresse oxidativo (4mM de H₂O₂). Após 20 minutos em condições estressantes foi acrescentado 30μCi de L-[³⁵S]-metionina em cada frasco e incubado sob estresse por mais 40 minutos. Controles com culturas não estressadas também foram marcados com metionina nos mesmos tempos. Todas as culturas foram filtradas à vácuo, os micélios foram lavados exaustivamente e congelados imediatamente a -80°C. Sendo posteriormente preparados os extratos livres de células, dialisados e dosado o teor de proteínas, que foi padronizado para o preparo de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Após a corrida o gel foi fixado com metanol: ácido tricloroacético: ácido acético (30:10:10), corado para proteínas com Azul de Coomassie Brilhante R-250 e descorado com uma solução de metanol, ácido acético glacial e água destilada na proporção 3:1:6, então o gel foi fotografado, seco em 60°C à vácuo em papel de filtro e submetido a uma autoradiografia, utilizando um filme Hyperfilm-ECL da Amersham.

3. RESULTADOS

3.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.1.1 CRESCIMENTO DE *Dactylium dendroides*

Conforme determinado por MARKUS (1965) o fungo *Dactylium dendroides*, nas condições do ensaio atinge o seu crescimento máximo em 60 horas, após este tempo há uma redução da massa micelial (vide **figura 1**). Em 36 horas ocorre o final da fase exponencial de crescimento do microrganismo e o início da fase estacionária. Em todos os experimentos os micélios foram cultivados por 24 horas, estando neste período na fase logarítmica de crescimento.

3.1.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Como primeira etapa no estudo do efeito dos diferentes estresses foi avaliada a viabilidade do microrganismo após os tratamentos empregados. Devido o fungo em estudo não esporular nas condições de laboratório, para se determinar a viabilidade foi necessário padronizar as condições do inóculo, utilizando o micélio, cujos dados estão apresentados na **figura 2**, onde esta relacionado, na ordenada, a absorbância a 680 nm da suspensão da cultura e na abcissa, o peso seco (mg/mL) do micélio. Com as diluições empregadas foi obtida uma curva linear, onde foi observado que a massa micelial é diretamente proporcional a absorbância da cultura. Com o emprego desta curva pode-se corrigir os valores dos inóculos empregados nos estresses, de modo que, pudesse ser avaliado apenas o resultado do tratamento empregado sem a interferência de diferenças de inóculo.

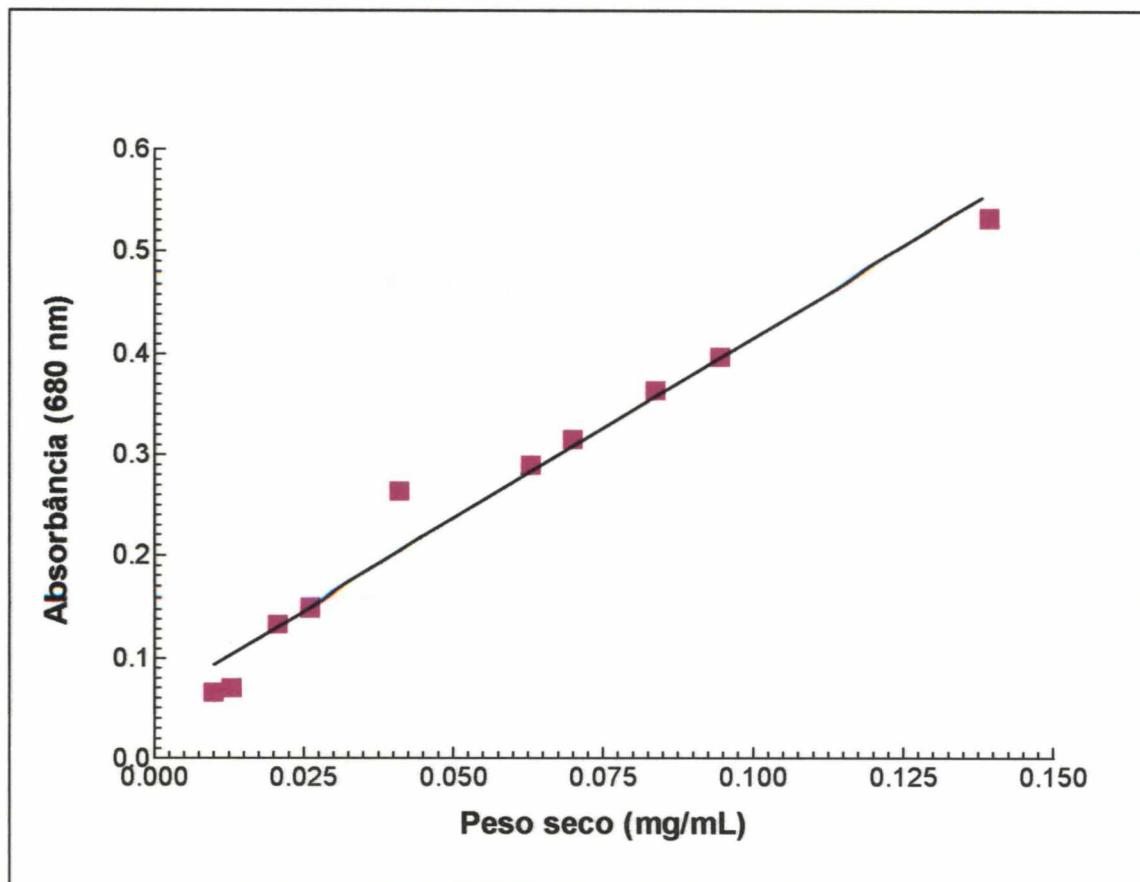


FIGURA 2 - Curva de padronização do inóculo.

Após 24 horas de cultivo as culturas foram diluídas e avaliada a turbidez a 680 nm e a massa micelial por peso seco, conforme descrito no item 2.8 de MATERIAIS E MÉTODOS. Os valores numérico apresentados são médias de triplicatas.

3.1.3 DETERMINAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Foi também relacionada a absorbância da cultura com as unidades formadoras de colônia - UFC, obtidas por contagem em placas, das células viáveis, conforme demonstrado na **figura 3**. No caso do *Dactylium dendroides*, por ter um crescimento micelial, houve a necessidade de se acrescentar sorbose ao meio de cultura sólido, que por inibir o crescimento de hifas, faz com que o fungo se desenvolva em forma de colônias (TATUM et al., 1949). Desta forma, pôde ser feita a contagem das células viáveis nas diluições empregadas, que mostrou ser diretamente proporcional a absorbância da cultura e avaliada a viabilidade do microrganismo mediante as condições estressantes.

3.1.4 CONSUMO DE GLUCOSE

Foi determinado o consumo de glucose pelo microrganismo. Nos estresse térmico e oxidativo não houve diferenças no teor de glucose residual, indicando que o consumo da fonte de carbono em todos os tratamentos, quer seja nos controles ou nos estresses, foi similar. No estresse térmico à 40°C foi observado o valor médio de 82,5% no consumo de glucose, para todos os tempos de exposição ao calor. No tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, também não houve variação, sendo encontrado o valor médio de 52,6% para o consumo de glucose. Os valores encontrados para o estresse etanólico estão apresentados na **tabela I**, tendo as culturas tratadas um menor consumo de glucose em relação aos controles.

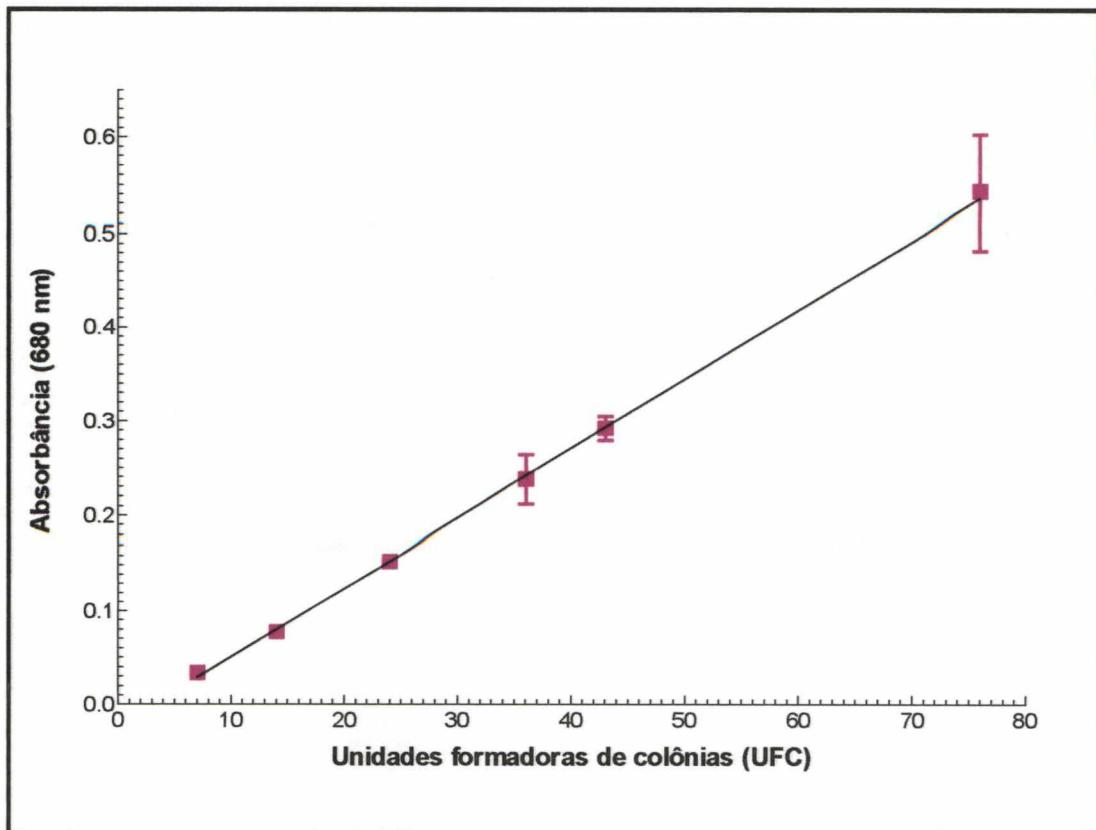


FIGURA 3 - Curva para determinação da unidades formadoras de colônias

A cultura com 24 horas de crescimento foi homogeneizada e semeada em meio sólido ágar Sabouraud com 10 mM de sorbose, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.8. A contagem de colônias foi feita após 24 horas de crescimento. Foram realizadas três determinações, para cada ponto da curva.

TABELA I - CONSUMO DE GLUCOSE DE *Dactylium dendroides* APÓS SUBMETIDO AO ESTRESSE ETANÓLICO

TEMPO	CONTROLE (S/ ETANOL)		TRATADO (C/ETANOL)	
	GLUCOSE RESIDUAL (mg%)	CONSUMO (%)	GLUCOSE RESIDUAL (mg%)	CONSUMO (%)
2 HORAS	28,00	61,3	49,0	32,4
4 HORAS	22,00	69,6	52,0	28,2
8 HORAS	1,05	98,6	7,0	90,3

A dosagem de açúcar foi determinada no meio de cultura após o fungo ser exposto a 2,0% (p/v) de etanol, empregando-se o método da glucose oxidase (DAHLQUIVIST, 1961). O estresse etanólico foi realizado conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS no item 2.15.3. A porcentagem de consumo de glucose dos ensaios, foi calculada considerando 0% de consumo a dosagem de açúcar do meio no tempo zero de estresse.

3.2 EFEITO DO ESTRESSE ETANÓLICO SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE

3.2.1 GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR

As culturas de *Dactylium dendroides* foram expostas a concentração de 2,0% (p/v) de álcool etílico, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.15.3. Como apresentado na **figura 4**, foi determinada a atividade enzimática extracelular de galactose oxidase e foi observado que com 8 horas de tratamento, em comparação com o controle, ocorreu a perda de 63% na atividade enzimática.

3.2.2 GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

Os níveis de galactose oxidase intracelular foram detectados nos extratos celulares após o fungo *Dactylium dendroides* ser submetido ao estresse etanólico. Como mostra a **figura 5**, ocorreu uma queda de atividade enzimática nas culturas tratadas, quando comparadas com os controles; foi observado uma diminuição na atividade de 37% após 8 horas de tratamento com 2.0% (p/v) de álcool etílico.

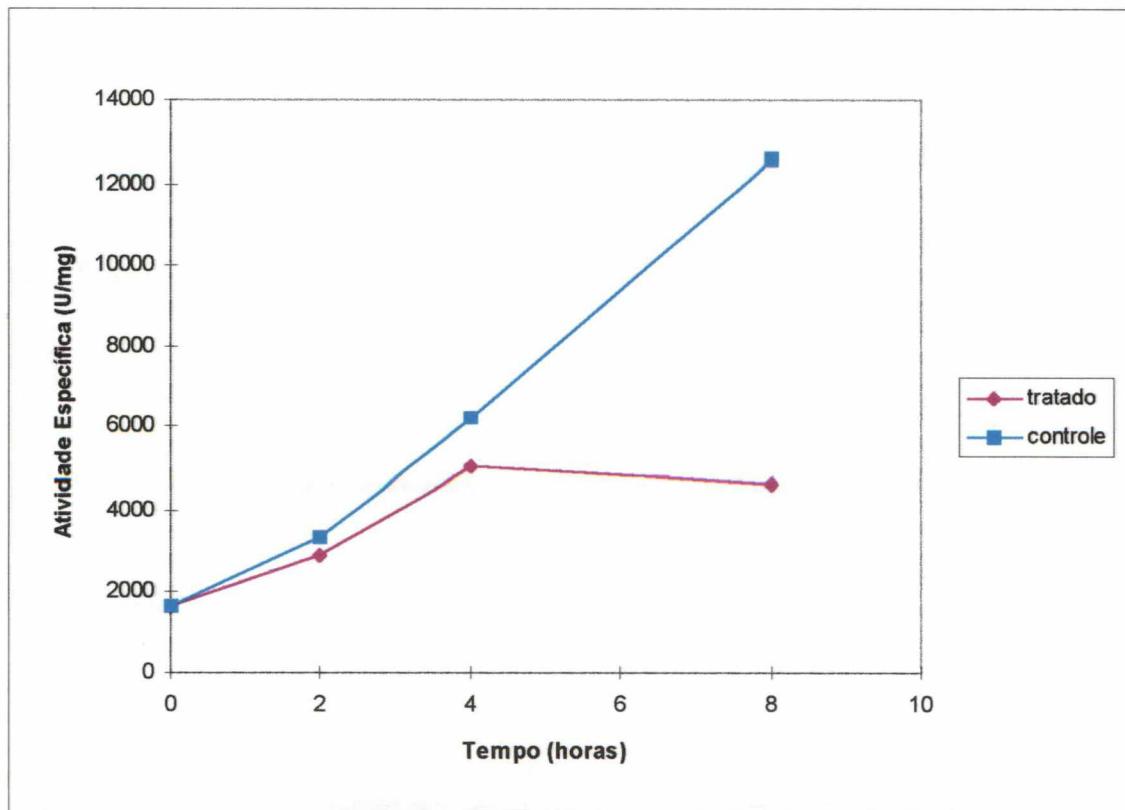


FIGURA 4 - Efeito do estresse etanólico sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em *Dactylium dendroides*.

A cultura com 24 horas de crescimento foi transferida para o Meio Mínimo de Markus acrescido de 2,0% (p/v) de etanol, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.15.3. A atividade da enzima galactose oxidase extracelular foi determinada pelo método de AISAKA e TERADA (1981).

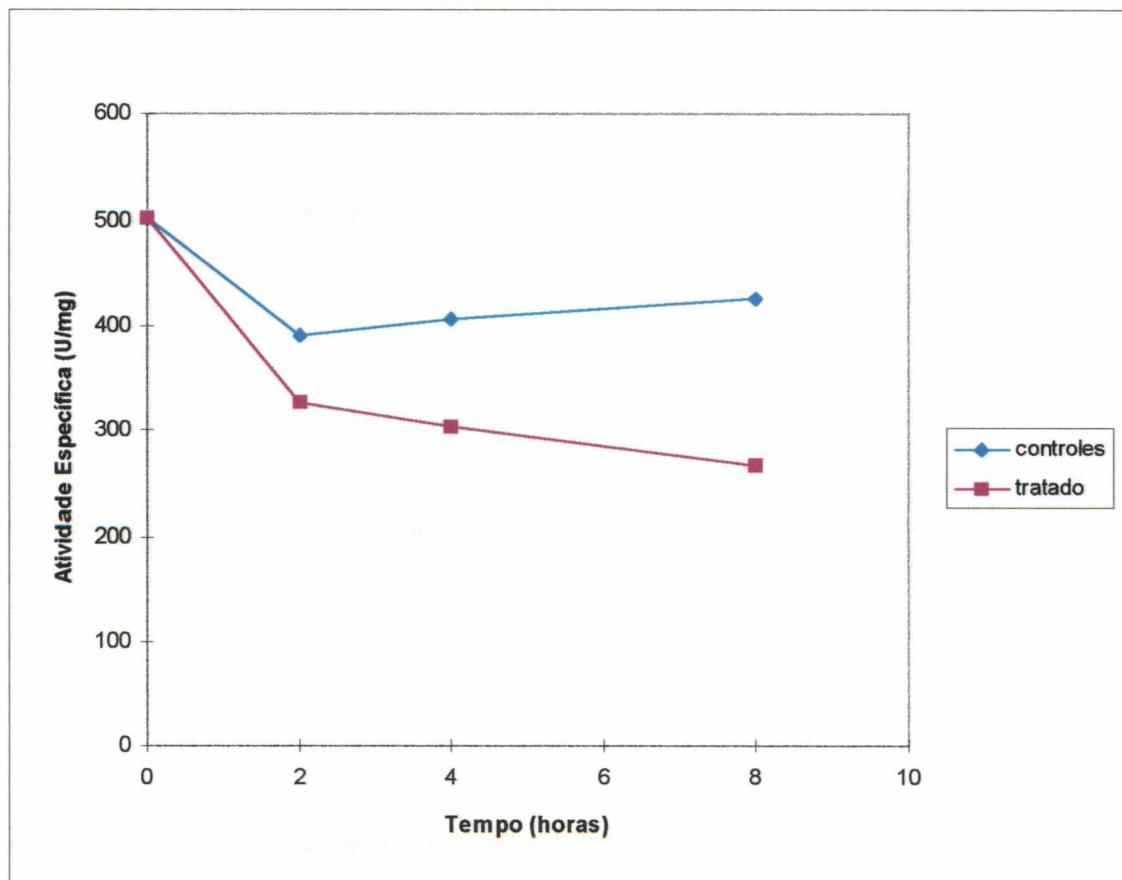


FIGURA 5 - Efeito do estresse etanólico sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em *Dactylium dendroides*.

O fungo foi exposto a 2,0% (p/v) de etanol por diferentes tempos (0-8 horas), sendo descritas as condições experimentais em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.15.3. As culturas foram filtradas à vácuo e dos micélios foram preparados os extratos, nos quais foi determinada a atividade da enzima galactose oxidase pelo método de AISAKA e TERADA (1981).

3.3 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES SUBMETIDAS AO ESTRESSE ETANÓLICO

Foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS para determinar o perfil das proteínas intracelulares submetidas ao estresse etanólico, sendo o procedimento descrito no item 2.13 de MATERIAIS E MÉTODOS. Como demonstrado na **figura 6**, foi observado aumento de bandas de proteínas com pesos moleculares estimados em torno de 76, 66, 49, 43, 35 e 33 kDa, não foi possível detectar bandas que estivessem com teores proteicos diminuídos. A banda que corresponde a galactose oxidase padrão não apresentou diferenças no seus teor, quando comparados os controles com os tratados com etanol.

3.4 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE ETANÓLICO

Foram utilizados anticorpos anti-galactose oxidase para detectar os níveis da enzima galactose oxidase, sendo o procedimento descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.14. Como apresentado na **figura 7**, após o micélio ser submetido ao estresse etanólico se observa uma diminuição na intensidade das bandas, sendo menor em 8 horas de tratamento.

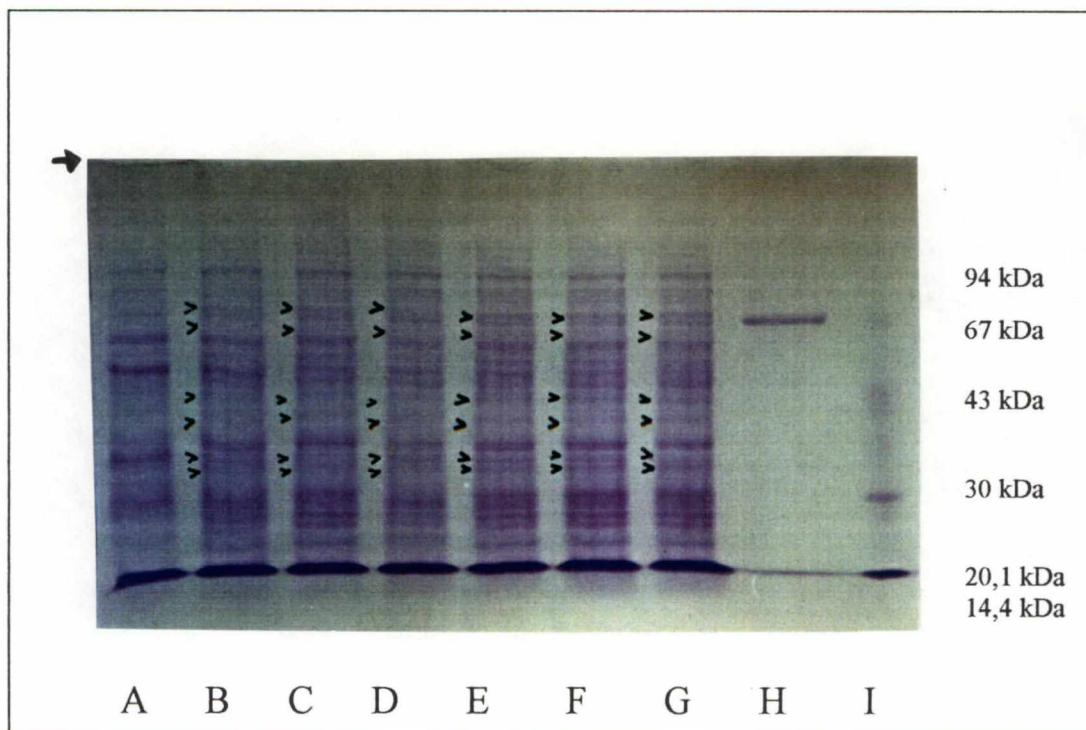


FIGURA 6 - Perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao estresse etanólico

Os extratos livres de células, tratados com PMSF, foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.13. Foram aplicadas 50 µg de proteínas de cada extrato analisado e 45ng de galactose oxidase purificada. O estresse foi realizado com a concentração de 2% (p/v) de etanol.

- ➔ indica a origem da migração
- > indica as proteínas alteradas com o estresse

A-tempo zero

B-sem etanol exposto por 2 horas

C-sem etanol exposto por 4 horas

D-sem etanol exposto por 8 horas

E-tratado exposto por 2 horas

F-tratado exposto por 4 horas

G-tratado exposto por 8 horas

H-galactose oxidase purificada

I-marcadores de peso molecular

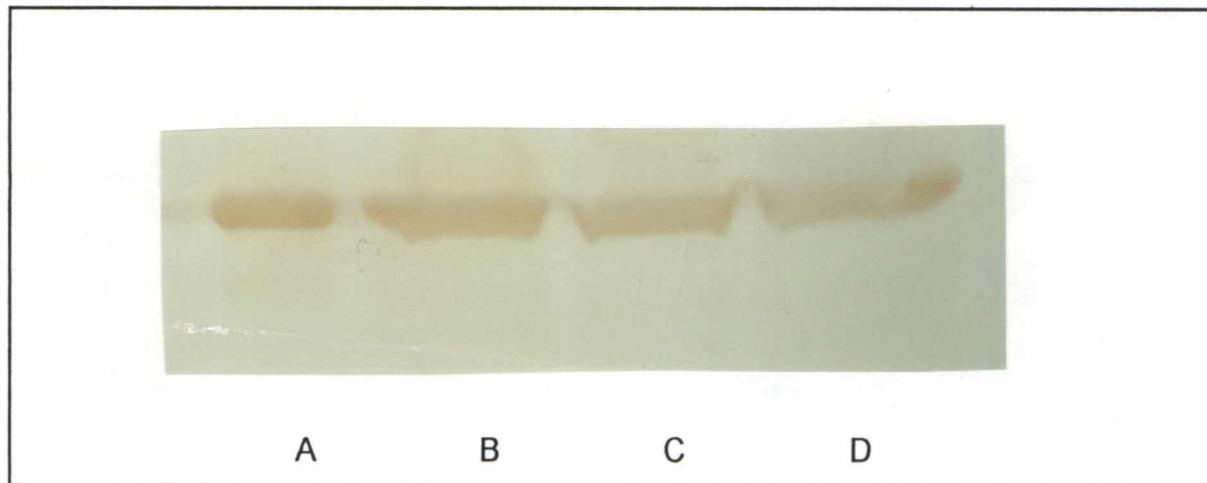


FIGURA 7 - “Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse etanólico.

Foram utilizados anticorpos policlonais anti-galactose oxidase, como anticorpo secundário, anti IgG de coelho conjugado com peroxidase e o substrato foi o-dianizidina, conforme descrito no item 2.14. Todas as amostras foram padronizadas para conter 500 μ g de proteínas e a galactose oxidase 22,5ng. O estresse foi realizado com 2% (p/v) de etanol.

- A- galactose oxidase purificada;
- B- tratado exposto por 8 horas;
- C- sem etanol exposto por 8 horas;
- D- tempo zero.

3.5 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A VIABILIDADE DO MICRORGANISMO

Com a finalidade de se determinar a porcentagem de sobrevivência do microrganismo nas condições estressantes adotadas, o micélio foi exposto a temperatura normal de crescimento (28°C) e aos choques térmicos de 40°C e 45°C ; amostras da cultura que estavam em Meio Mínimo foram retiradas nos diversos tempos, homogeneizadas e semeadas em meio Sabouraud com 10mM de sorbose, a contagem da unidades formadoras de colônias foi feita após 24 horas de incubação a temperatura de 28°C . Pode ser verificado pela **figura 8** que o fungo quando submetido a temperaturas superiores à 28°C teve sua taxa de sobrevivência diminuída. Ao ser exposto por 10 minutos à 40°C o microrganismo teve um decréscimo de 65% em sua viabilidade, sendo esta porcentagem gradativamente maior a medida que foi aumentado o tempo de exposição ao calor. Na temperatura de 45°C após 10 minutos de tratamento o fungo teve uma diminuição de 85% em sua viabilidade, chegando a 97% após 60 minutos de exposição. Ainda foi determinada a viabilidade do *Dactylium dendroides* à temperatura de 50°C , porém nesta temperatura não foi observado desenvolvimento do fungo, sendo então, nas condições experimentais adotadas a temperatura de 50°C letal para o microrganismo (dados não apresentados). Também foi observado que a extensão radial das colônias foi menor em todos os tratamentos com relação aos controles, sendo esta diminuição mais acentuada a partir do tratamento em 45 minutos de exposição.

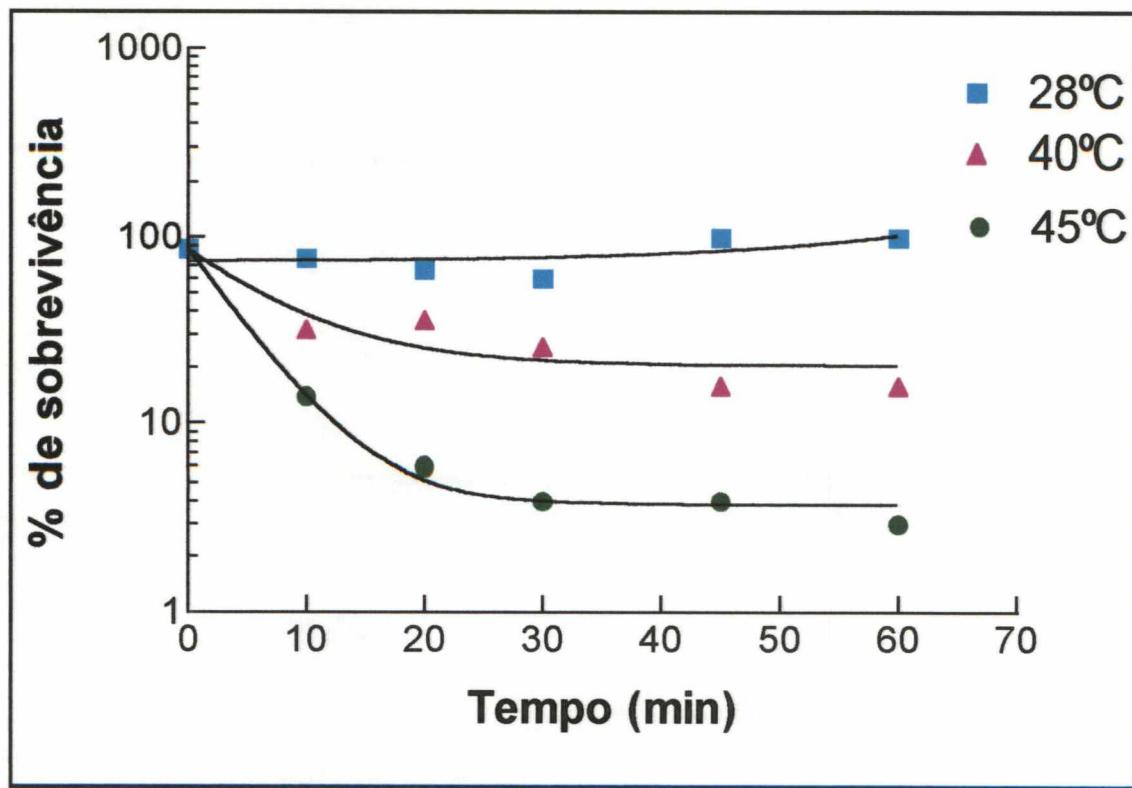


FIGURA 8 - Efeito da temperatura sobre a viabilidade de *Dactylium dendroides*.

Após as células serem submetidas a diferentes temperaturas, nos diferentes tempos, as culturas foram diluídas e semeadas em Meio Sabouraud com 10 mM de sorbose, conforme descrito de MATERIAIS E MÉTODOS item 2.15. Os valores de cem porcento de sobrevivência correspondem a contagem de colônias de um cultivo recolhido no tempo zero de estresse. Os dados apresentados são médias de triplicata.

3.6 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO À 45°C SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE

3.6.1 GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR

Após expor o micélio de *D. dendroides* a um estresse térmico de 45°C, foi dosada a atividade de galactose oxidase extracelular. A atividade enzimática extracelular, conforme mostrado na **figura 9**, teve um aumento já nos primeiros 10 minutos de tratamento, em comparação ao controle à 28°C; em 20 minutos de exposição ao calor teve em atividade específica o valor de 1876 U/mg, o que representa um aumento de 1 vez em relação ao controle, com 937 U/mg. Aos 45 minutos ocorre uma diminuição da atividade enzimática, quando comparada com os tratamentos em menores tempos, porém ainda assim a atividade é maior que nos controle. Este perfil de ativação foi observado tanto a 45°C como a 40°C, em vários ensaios realizados.

3.6.2 GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

Os extratos livres de células dos micélios submetidos ao estresse de 45°C foram preparados como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS no item 2.12, sendo então realizada a dosagem de galactose oxidase intracelular. Como mostra a **figura 10**, a atividade enzimática apresentou aumento em todos os tratamentos, quando comparados com os controles, chegando a 0,32 vezes em 60 minutos.

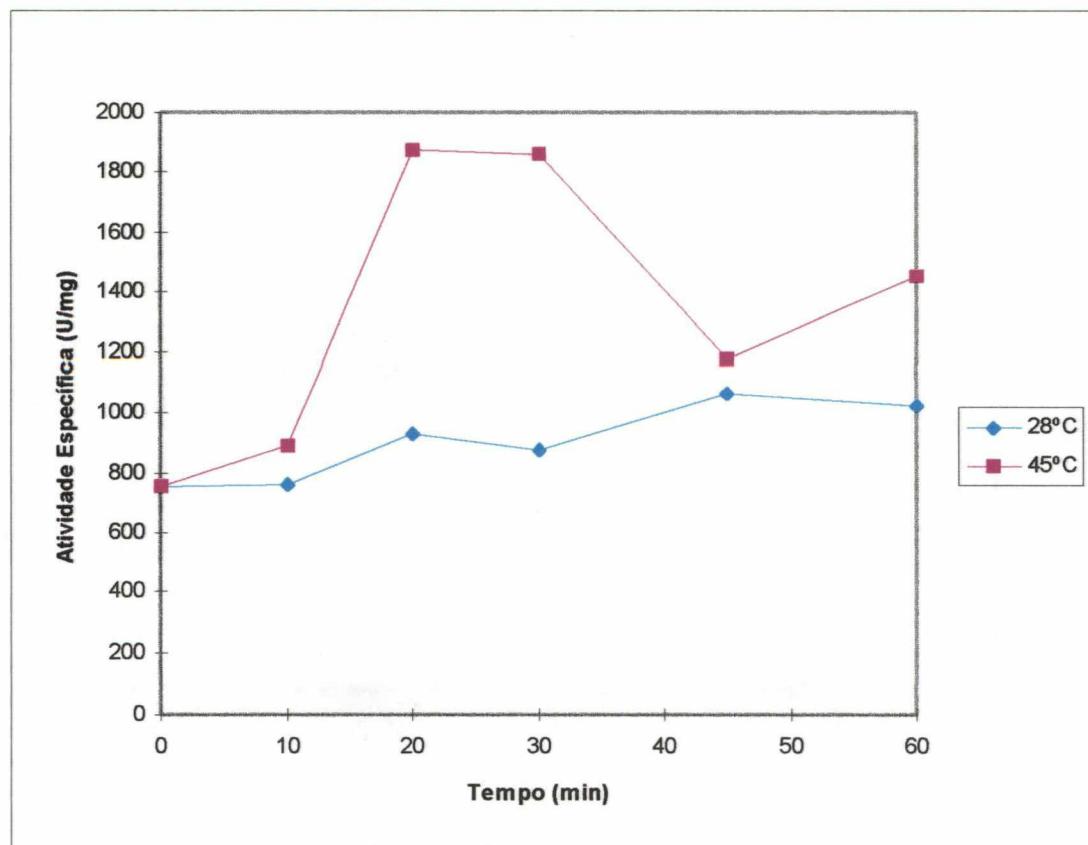


FIGURA 9 - Efeito do estresse térmico à 45°C sobre os níveis de galactose oxidase extracelular.

As condições experimentais do estresse foram descritas em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.15.1. Sendo o estresse realizado a temperatura de 45°C, em diferentes tempos, o micélio foi separado por filtração e no filtrado a atividade da enzima galactose oxidase foi determinada pelo método de AISAKA e TERADA (1981).

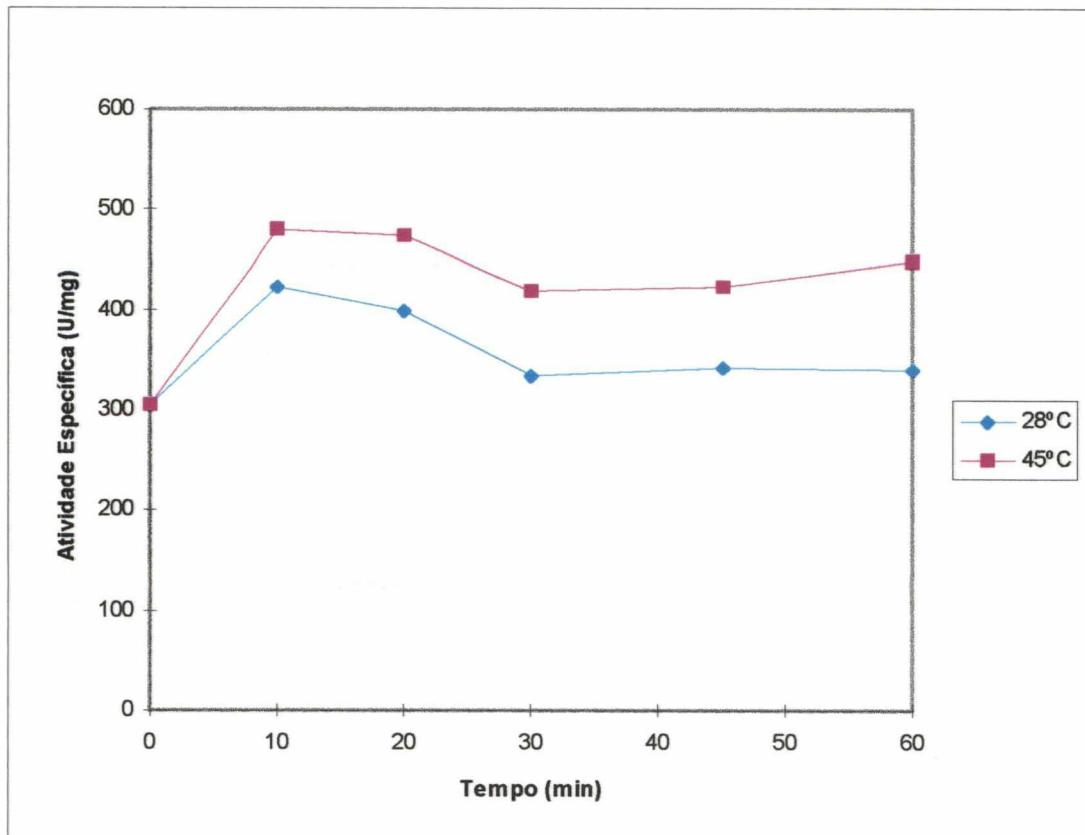


FIGURA 10 - Efeito do estresse térmico à 45°C sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em *Dactylium dendroides*.

A atividade da enzima galactose oxidase intracelular foi determinada pelo método de AISAKA e TERADA (1981), após rem preparados os extratos celulares a partir das culturas que receberam o choque térmico, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS no item 2.15.1

3.7 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO À 40°C SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE

Havendo constatado que o estresse térmico afeta os níveis de galactose oxidase e considerando que a exposição do micélio à 45°C por 60 minutos provoca um decréscimo da viabilidade em 97%, optou-se por estudar o efeito do estresse térmico em condições menos drásticas, ou seja à 40°C.

3.7.1 GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR

A determinação da enzima galactose oxidase extracelular foi realizada após o fungo ser submetido a um estresse de 40°C, como pode ser verificado na **figura 11**, houve um aumento da atividade enzimática, quando comparada com o controle, em resposta a elevação da temperatura. Após 20 minutos de exposição ocorreu um aumento de 4,5 vezes, passado 30 minutos houve uma diminuição dos níveis da enzima, porém ainda permaneceram superiores aos controles.

3.7.2 GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

Os micélios do microrganismo foram separados, por filtração à vácuo, e preparados os extratos livres de células, nos quais foi determinada a atividade da enzima galactose oxidase intracelular, como mostra a **figura 12**. Foi observado um

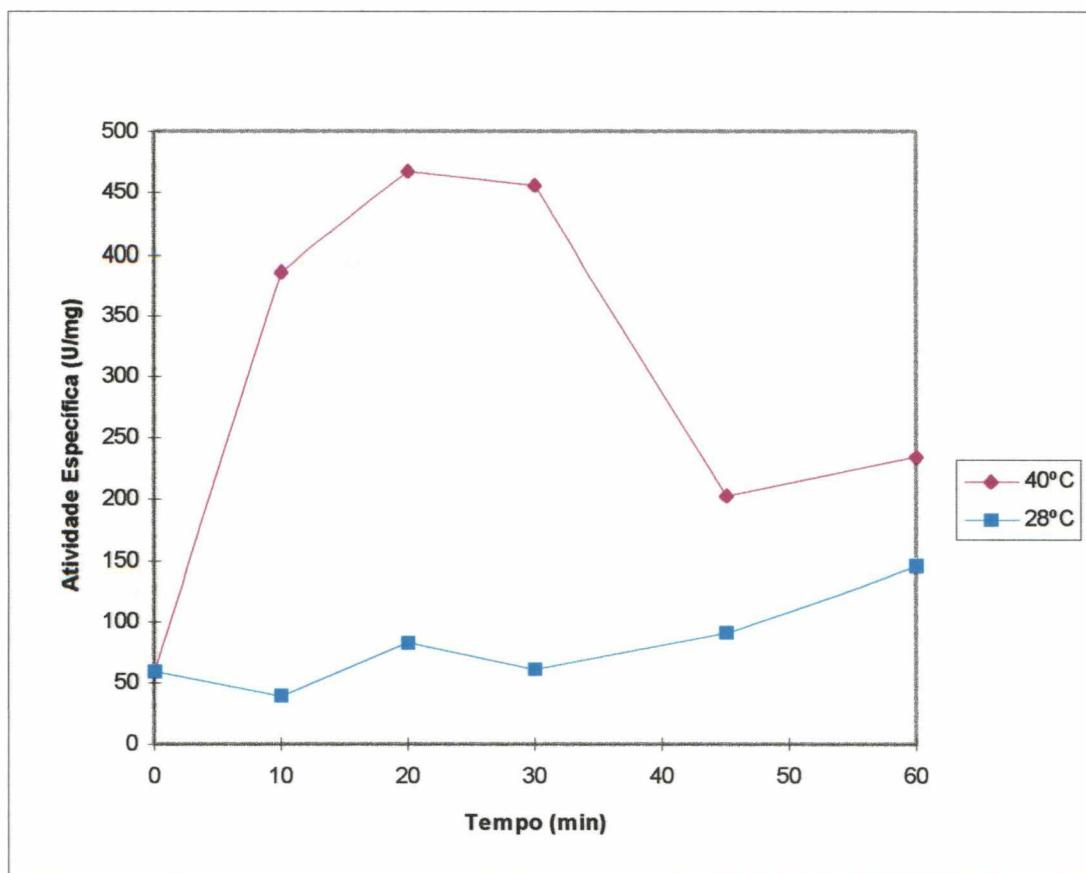


FIGURA 11 - Efeito do estresse térmico à 40°C sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em *Dactylium dendroides*, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAS E MÉTODOS item 2.15.1.

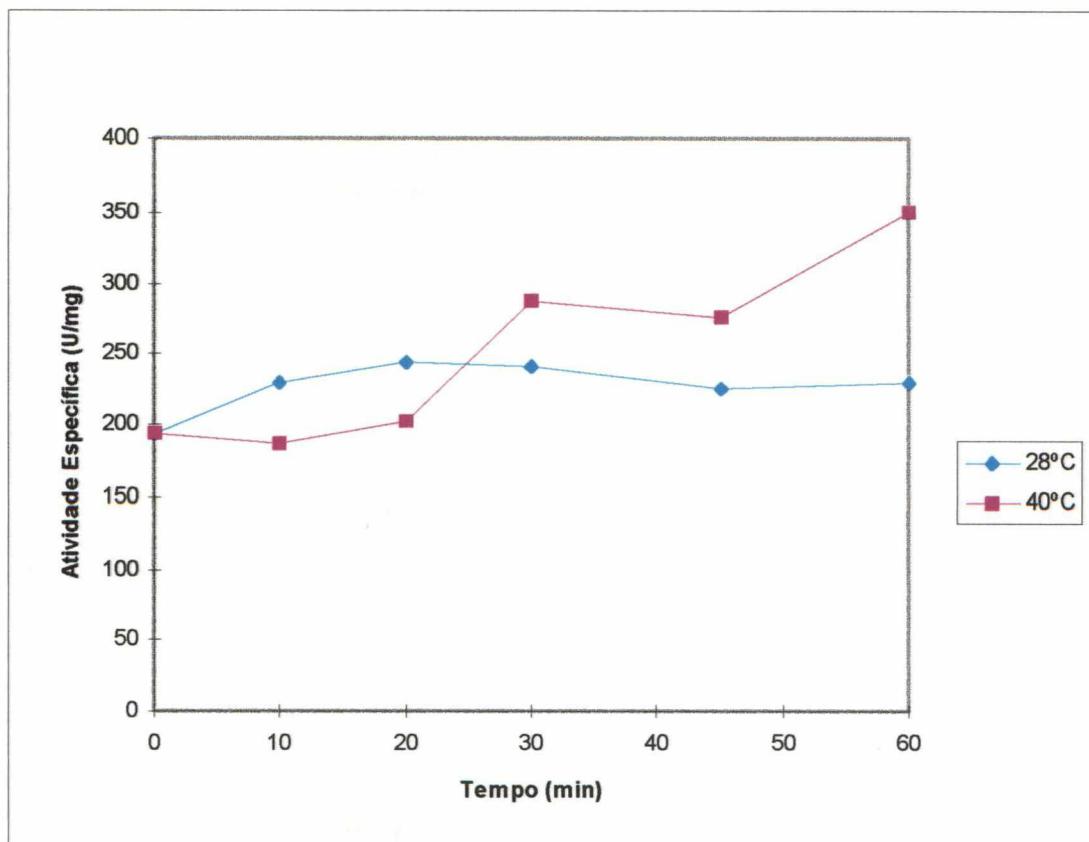


FIGURA 12- Efeito do estresse térmico à 40°C sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em *Dactylium dendroides*, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAS E MÉTODOS item 2.15.1.

aumento de 0,2 vezes na atividade após 20 minutos de exposição ao calor, permanecendo aumentada nos tempos subsequentes do experimento.

3.8 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO À 40°C SOBRE OS NÍVEIS DA ENZIMA E EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA

O fungo *D. dendroides* foi submetido a um estresse térmico a temperatura de 40°C e em presença de cicloheximida, um inibidor de síntese proteica (OBRIG et. al, 1971), conforme descrito no item 2.16.1 de MATERIAIS E MÉTODOS, os resultados estão apresentados na **tabela II** e mostram que após 20 minutos de estresse houve um aumento de 0,5 vezes na atividade enzimática específica intracelular e 1,13 vezes na atividade enzimática extracelular. Porém, ao serem comparados os valores dos níveis da enzima nos tratamentos com cicloheximida e nos controles sem cicloheximida, não houve diferenças, permanecendo os valores numéricos muito próximos. Isto indica que a cicloheximida não afetou os níveis da enzima quando o fungo foi exposto ao choque térmico. Para confirmar este efeito, novo experimento foi realizado, agora na temperatura de 45°C e o mesmo resultado foi obtido (dados não mostrados).

TABELA II -EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO À 40°C SOBRE OS NÍVEIS DA ENZIMA GALACTOSE OXIDASE EM PRESENÇA DE CICLOHEXIMIDA

	ATIVIDADE INTRACELULAR (U/mg)	ATIVIDADE EXTRACELULAR (U/mg)
TEMPO ZERO	164.2	175.3
CONTROLE(28°) SEM CICLOHEXIMIDA	162.9	277.2
CONTROLE(28°C) COM CICLOHEXIMIDA	150.4	289.4
TRATADO(40°C) SEM CICLOHEXIMIDA	256.4	373.6
TRATADO(40°C) COM CICLOHEXIMIDA	251.0	388.5

A cicloheximida foi adicionada ($20\mu\text{g/ml}$) nas culturas ao ser iniciado o estresse (tempo zero), e foram tratadas por 20 minutos à 40°C, em condições experimentais conforme descritas em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.16

3.9 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES SUBMETIDAS AO CHOQUE TÉRMICO DE 40°C

Para se determinar o perfil das proteínas intracelulares submetidas ao choque térmico, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS. Devido a observação de intensa proteólise, os extratos foram preparadas com PMSF (Phenyl methyl sulphonyl fluoride-inibidor de serin proteases), conforme MATERIAIS E MÉTODOS itens 2.12 e 2.13. A **figura 13** mostra a separação das proteínas intracelulares. Em 10 minutos de estresse térmico houve o desaparecimento de uma banda com peso molecular em torno de 74 KDa, e após 60 minutos não foram mais visualizadas bandas com pesos moleculares de 87, 54, 37 e 26 KDa. Estas proteínas também apresentaram-se diminuídas nos controles, a medida que foi aumentado o tempo de exposição do fungo ao calor. A banda de 72 KDa correspondente a galactose oxidase padrão apareceu bastante delgada, sem alteração significativa entre o controle (28°C) e o exposto ao estresse térmico (40°C).

3.10 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE TÉRMICO

Para detectar os níveis de galactose oxidase, foi feita uma eletroforese SDS-PAGE e em seguida um “western blotting”, utilizando anticorpos policlonais anti-galactose oxidase. Como apresentado na **figura 14**, a enzima galactose oxidase

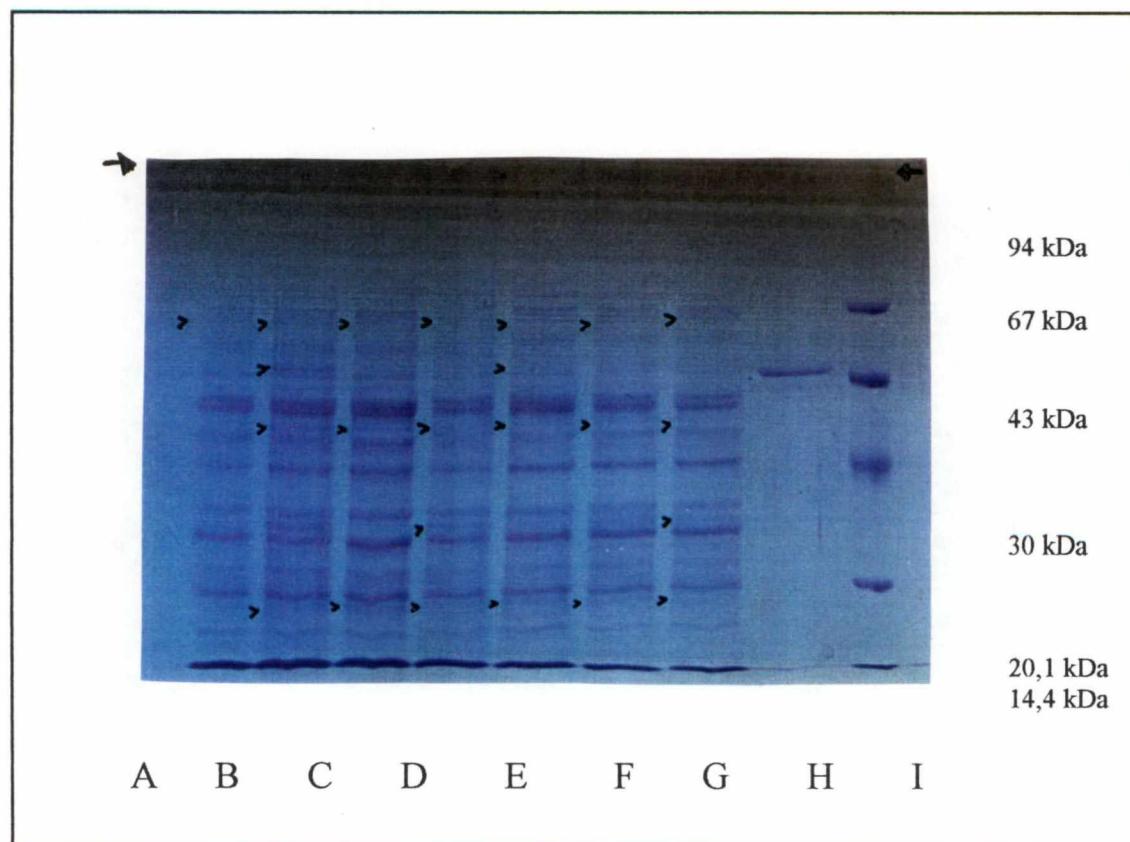


FIGURA 13 - Perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao choque térmico

Os extratos livres de células foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.13. Foram aplicadas 50 µg de proteínas de cada extrato analisado e 45ng de galactose oxidase purificada.

- indica a origem da migração
- > indica as proteínas alteradas com o estresse

- | | |
|---|---|
| A-tempo zero | E-tratamento (40°C) exposto por <u>10 min</u> |
| B-controle (28°C) exposto por <u>10 min</u> | F-tratamento (40°C) exposto por <u>30 min</u> |
| C-controle (28°C) exposto por <u>30 min</u> | G-tratamento (40°C) exposto por <u>60 min</u> |
| D-controle (28°C) exposto por <u>60 min</u> | H-galactose oxidase purificada |
| | I-marcadores de peso molecular |

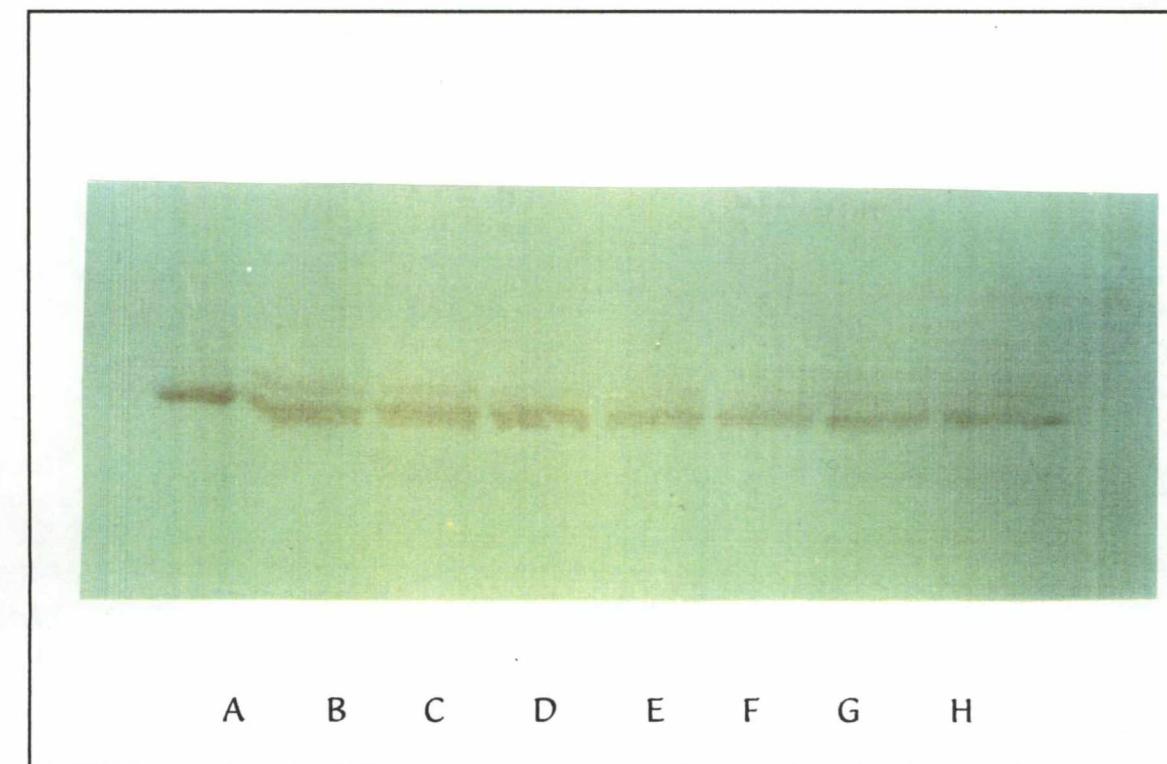


FIGURA 14 - “Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse térmico

Foram utilizados anticorpos policlonais anti-galactose oxidase, como anticorpo secundário, anti IgG de coelho conjugado com peroxidase e o substrato foi o-dianizidina, conforme descrito no item 2.14. Todas as amostras foram padronizadas para conter 500 μ g de proteínas e a galactose oxidase purificada 22,5ng.

A- galactose oxidase purificada;
B- tratado por 60 min à 40°C;
C- tratado por 30 min à 40°C;
D- tratado por 10 min à 40°C;

E- tratado por 60 min à 28°C;
F- tratado por 30 min à 28°C;
G- tratado por 10 min à 28°C;
H- micélio sem tratamento.

intracelular, quando revelada com o substrato *o*-dianizidina, apresentou nas amostras que receberam choque térmico, bandas com coloração mais intensa do que os controles, confirmando assim que os níveis da galactose oxidase intracelular aumentaram quando o fungo foi submetido a um estresse térmico de 40 °C.

3.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A VIABILIDADE DO MICRORGANISMO

A cultura de *Dactylium dendroides* foi exposta a concentrações crescentes de H₂O₂ e então determinada a porcentagem de sobrevivência do microrganismo, frente ao estresse oxidativo. Como mostra a figura 15, a viabilidade decresceu em 50% no tratamento com 1 mM de H₂O₂, permanecendo neste nível até 15 mM, na concentração de 30 mM não houve crescimento, sendo esta concentração letal para o fungo. A extensão radial das colônias decresceu quando o micélio foi submetido a concentrações superiores a 1 mM.

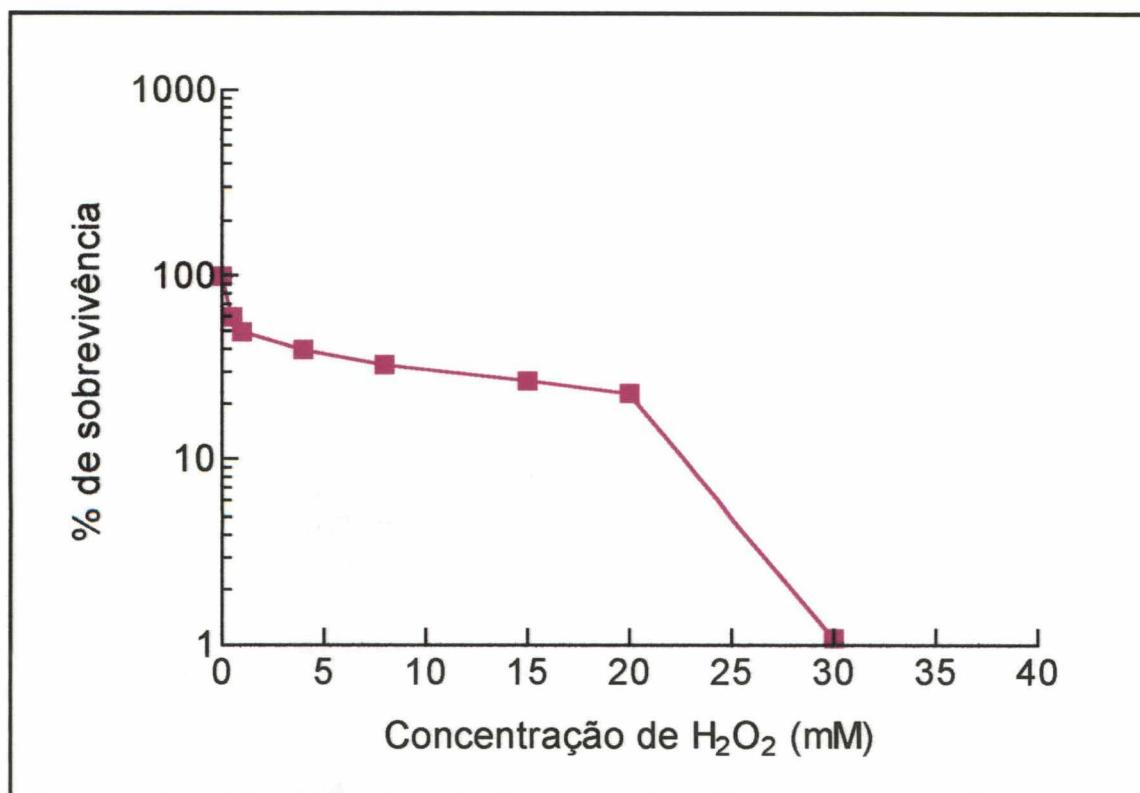


FIGURA 15 -Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade de *Dactylium dendroides*, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAIS e MÉTODOS item 2.15.

Os valores de cem por cento de sobrevivência correspondem a contagem de colônias de um cultivo recolhido no tempo zero de estresse. Os dados apresentados são médias de triplicata.

3.12 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE

3.12.1 GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR

O fungo foi exposto por 60 minutos a diferentes concentrações de H_2O_2 , foi então determinada a atividade enzimática extracelular. Como demonstrado na **figura 16**, a maior atividade enzimática foi observada em 4 mM de H_2O_2 , ocorrendo um aumento de 3 vezes em sua atividade, em concentrações superiores houve uma queda de atividade, porém permanecendo acima do controle sem adição de peróxido de hidrogênio. Foi ainda observado que o estresse oxidativo promove um aumento na secreção de proteínas. Dessa maneira a atividade específica da galactose oxidase decresce nas concentrações mais altas de peróxido de hidrogênio.

3.12.2 GALACTOSE OXIDASE INTRACELULAR

Conforme mostra a **figura 17**, quando o micélio foi exposto a concentrações crescentes de H_2O_2 , houve um aumento proporcional na atividade da galactose oxidase intracelular até o tratamento com 4mM, sendo observado um aumento de 2 vezes, e nas concentrações superiores de H_2O_2 ocorreu um decréscimo de atividade enzimática.

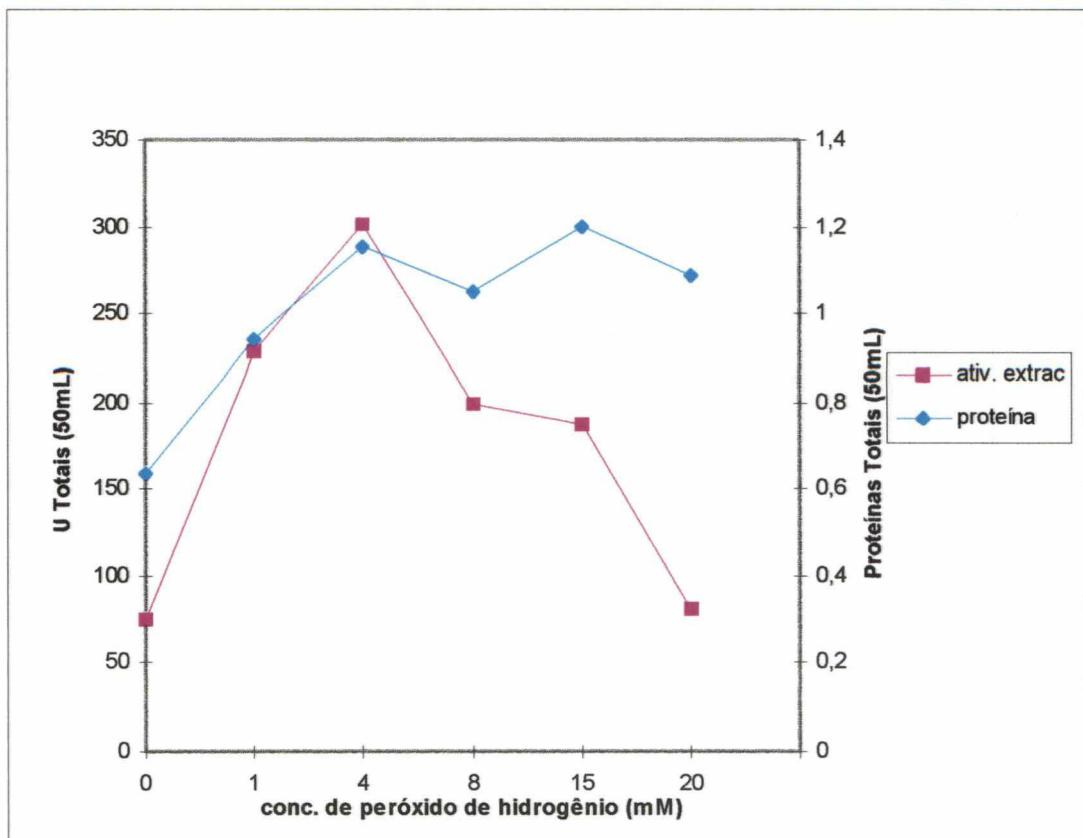


FIGURA 16 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre os níveis de galactose oxidase extracelular em *Dactylium dendroides*.

A cultura foi exposta a diferentes concentrações de H_2O_2 (0-20mM), sendo separado o micélio por filtração, conforme descrito em MATERIAIS e MÉTODOS item 2.15.2 . No filtrado foi determinada a atividade da enzima galactose oxidase extracelular pelo método de AISAKA e TERADA (1981).

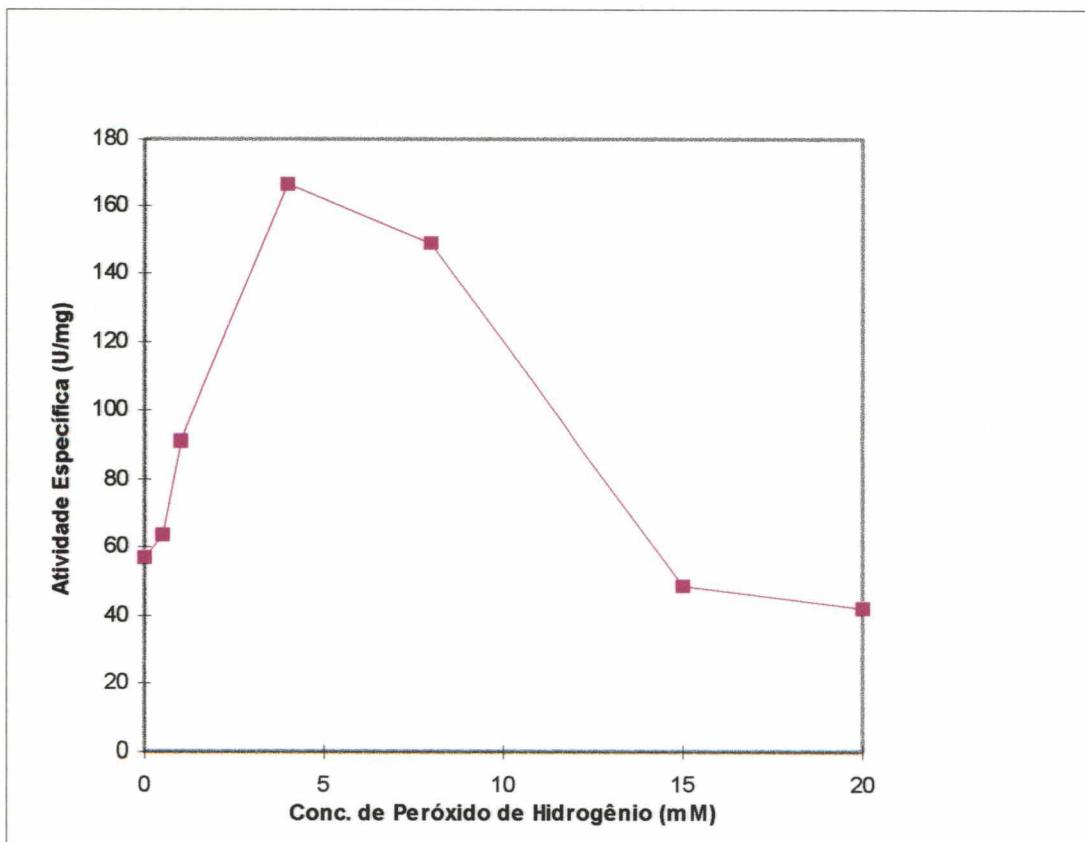


FIGURA 17 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre os níveis de galactose oxidase intracelular em *Dactylium dendroides* .

O procedimento empregado para o preparo do estresse foi realizado conforme descrito em MATERIAIS e MÉTODOS item 2.15.2 . Após as culturas serem submetidas ao estresse oxidativo, foram filtradas e dos micélios foram preparados os extratos livres de células, nos quais foi determinada a atividade da enzima galactose oxidase intracelular pelo método de AISAKA e TERADA (1981).

3.13 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS INTRACELULARES EXPOSTAS A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE, conforme descrito no item 2.13 de MATERIAIS E MÉTODOS, para analisar o perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao estresse oxidativo. A **figura 18** mostra o aumento de bandas com pesos moleculares em torno de 64, 52 e 50 kDa após serem expostas a 4 mM de H₂O₂ por 60 minutos. A banda correspondente a galactose oxidase padrão, na amostra exposta ao oxidante, também aumentou quando comparada com o controle.

3.14 DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE POR “WESTERN BLOTTING” NO ESTRESSE OXIDATIVO

Após as culturas serem submetidas ao estresse oxidativo, foram preparados os extratos livres de células e feita uma eletroforese SDS-PAGE, após a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e detectados os níveis de galactose oxidase com anticorpos policlonais contra a enzima, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS no item 2.14. Como demonstrado na **figura 19**, as amostras que apresentaram maior intensidade de coloração, nas bandas correspondentes a enzima, foram tratadas com 4,0 e 8,0 mM de H₂O₂, sendo a coloração mais pronunciada no tratamento com 4,0 mM, estando este perfil de acordo com os resultados obtidos para a atividade de galactose oxidase intracelular.

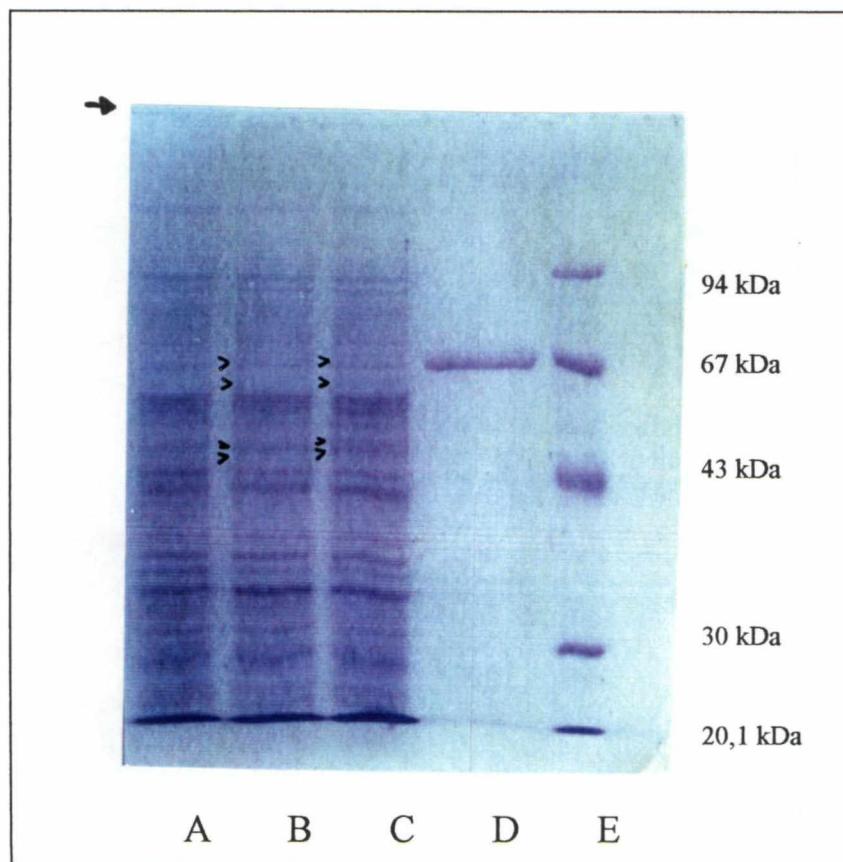


FIGURA 18 - Perfil eletroforético das proteínas intracelulares submetidas ao estresse oxidativo

Os extratos livres de células foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, em condições experimentais conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS item 2.13. Foram aplicadas 50 µg de proteínas de cada extrato analisado e 45ng de galactose oxidase purificada. O estresse foi conduzido por uma hora.

- ➔ indica a origem da migração
- > indica as proteínas alteradas com o estresse
- A- Tempo zero**
- B-controle, sem H₂O₂**
- C- tratado com 4,0 mM de H₂O₂**
- D- galactose purificada;**
- E- marcadores de peso molecular.**

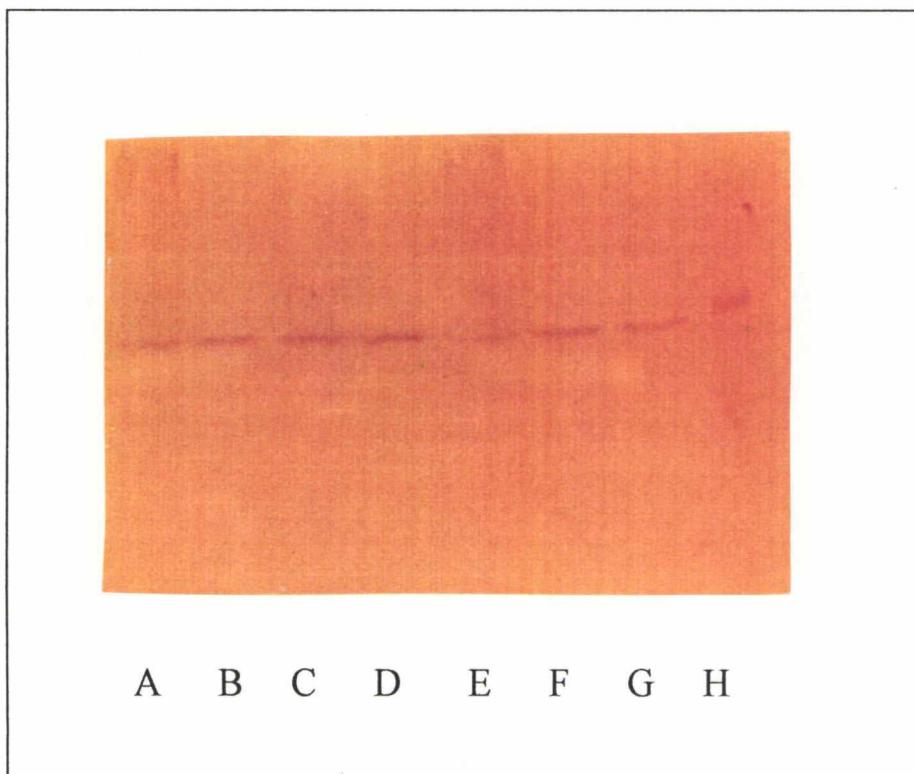


FIGURA 19 - “Western blotting” para detecção dos níveis de galactose oxidase intracelular no estresse oxidativo

Foram utilizados anticorpos policlonais anti-galactose oxidase, como anticorpo secundário, anti IgG conjugado com peroxidase e o substrato foi o-dianizidina, conforme descrito no item 2.14. Todas as amostras foram padronizadas para conter 500 μ g de proteínas e a galactose oxidase purificada 22,5ng.

A- tratado com 20 mM de H₂O₂;

B- tratado com 15 mM de H₂O₂;

C- tratado com 8,0 mM de H₂O₂;

D- tratado com 4,0 mM de H₂O₂;

E- tratado com 1,0 mM de H₂O₂;

F- tratado com 0,5 mM de H₂O₂;

G- micélio sem tratamento;

H- galactose purificada.

3.15 AUTORADIOGRAFIA DE PROTEÍNAS SUBMETIDAS A ESTRESSE OXIDATIVO

O micélio de *D. dendroides* foi submetido a estresse oxidativo com 4 mM de H₂O₂ por 60 minutos, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS no item 2.17, foi feito uma autoradiografia e observado a incorporação de L-[³⁵S]-metionina. A figura 20 mostra que houve diferenças no perfil do micélio tratado em comparação com o não tratado com H₂O₂. Foi observado que tiveram seus teores aumentados proteínas com pesos moleculares estimados em 64, 35 e 26 kDa, simultaneamente diminuiram proteínas com pesos moleculares em torno de 60, 32 e 29 kDa. Foi também visualizada uma banda não encontrada no controle, com peso molecular de 31 kDa. A banda com migração semelhante ao padrão de galactose oxidase não apresentou alteração entre o controle e no tratado com peróxido de hidrogênio.

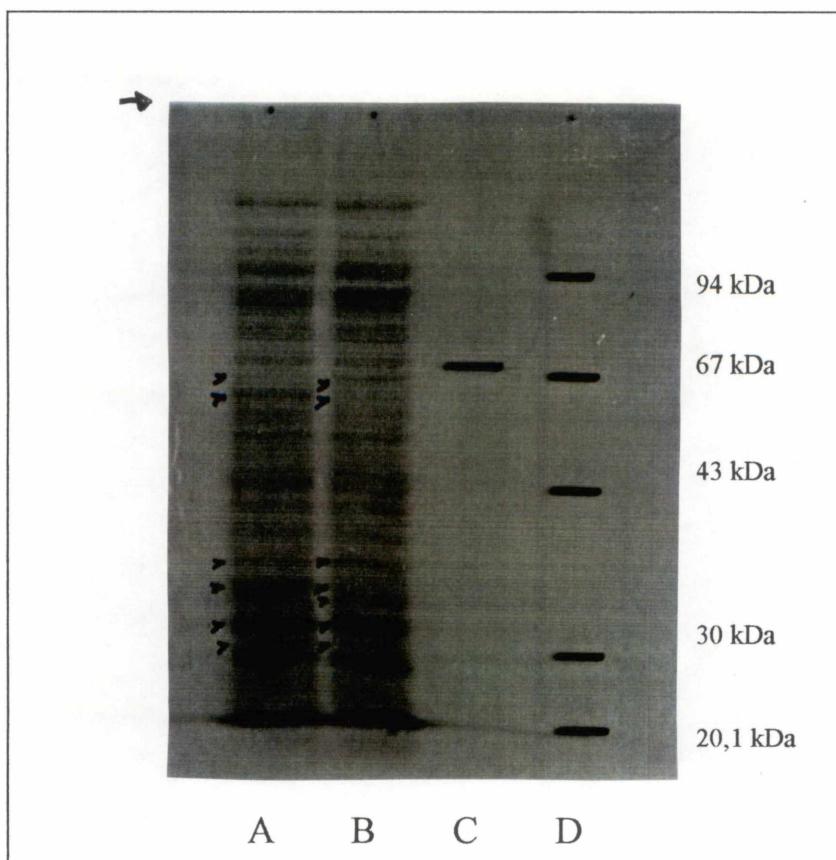


FIGURA 20 - Autoradiografia de proteínas intracelulares submetidas ao estresse oxidativo

O fungo foi exposto a 4 mM de H₂O₂ e recebeu um pulso de ³⁵S-metionina. Foram preparados os extratos livres de células para realizar uma eletroforese SDS-PAGE, as amostras foram aplicadas em duplicata, sendo uma parte corada para proteínas com Coomassie (figura 17), e da outra parte foi feita uma autoradiografia utilizando-se filme Hyperfilm-ECL, conforme descrito no item 2.17 de MATERIAIS E MÉTODOS.

- ➔ indica a origem da migração
- > indica as proteínas alteradas com o estresse
- A**-controle, sem H₂O₂;
- B**- tratado com 4,0 mM de H₂O₂;
- C**- galactose purificada (45ng);
- D**- marcadores de peso molecular.

4. DISCUSSÃO

As células de *Dactylium dendroides* foram submetidas a estresse etanólico e foi observado um aumento nos teores de proteínas intracelulares de 76, 66, 49, 43, 35 e 33 kDa (figura 6). ARNOSTI et al. (1986) também encontraram variação nos teores das proteínas de 76 e 66 kDa quando expuseram o *Bacillus subtilis* ao etanol. O aparecimento da proteína de 66 kDa, também foi confirmado por MICHEL e STARKA (1986) quando observaram o comportamento ao etanol de *Zymomonas mobilis*. A proteína de 35 kDa também foi detectada, mediante exposição ao etanol em *Neurospora crassa* (ROYCHOWDHURY e KAPOOR, 1988), *Candida albicans* (ZEUTHEN et al., 1988) e *Pseudomonas aeruginosa* (ALLAN et al., 1988).

Após a exposição de 8 horas foi observado que a galactose oxidase extra e intracelular teve seus níveis diminuídos quando em presença de 2,0% (p/v) de etanol (figuras 4 e 5). Esta observação foi confirmada pela reação com anticorpos específicos, demonstrando diminuição no teor da enzima (figura 7). Este perfil confirma os dados obtidos por MENDONÇA e ZANCAN (1989), que expuseram células de *D. dendroides* a concentrações crescentes de álcool etílico por 9 horas.

Nas culturas, após exposição ao álcool etílico, foi determinada a concentração de glucose residual, e foi notado um maior teor de glucose nas culturas tratadas, em comparação com os controles, demonstrando que o etanol provocou uma diminuição do consumo de glucose pelo fungo *D. dendroides*. Em 1965 já havia sido relatado o efeito do álcool de inibir a captação de glucose, sendo observado em *Neurospora crassa* a inibição de 45% em sua captação (LESTER,

1965). Em *S. cerevisiae*, também foi descrito que o etanol e outros álcoois afetam o transporte de glucose (LEÃO e VAN UDEN, 1982).

O efeito do etanol foi analisado com respeito a capacidade de induzir *hsp* e inibir a síntese proteica em *Neurospora crassa*, sendo observado uma inibição em mais de 50% das proteínas totais e concluído que a indução de *hsp* ocorreu com efeitos citotóxicos, afetando membranas e conformação de proteínas (MEYER et al., 1995).

O etanol interfere em vários processos celulares associados à membrana, bem como na secreção de enzimas (MERIVUORI, 1987). No caso do fungo *D. dendroides* o etanol afeta o grau de glicosilação da galactose oxidase, particularmente as cadeias glicosídicas *O*-ligadas, que ao serem modificadas afetam a estabilidade da enzima (MENDONÇA e ZANCAN, 1989).

O fungo *Dactylium dendroides* perde 85% de sua viabilidade quando submetido 10 minutos à 45°C, enquanto que um decréscimo de 5°C aumenta a viabilidade para 35% (figura 8), indicando ser a temperatura de 40°C menos drástica para sua sobrevivência. A capacidade dos microrganismos de resistir à temperaturas elevadas é muito variável, dependendo da temperatura de cultivo, bem como do estágio de crescimento. Desta forma McALISTER e FINKELSTEIN (1980) observaram uma diminuição na viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* quando a cultura recebeu um choque térmico de 52°C por 5 minutos. VANBOGELEN et al. (1987) demonstraram que *E. coli* teve seu crescimento diminuído quando foi transferida de 28°C para 50°C. Sendo a resposta dos microrganismo ao estresse térmico distinta conforme o tratamento empregado.

A exposição do fungo *Dactylium dendroides* a temperaturas de 45 e 40°C provocaram um aumento na atividade específica da galactose oxidase extracelular (figuras 9 e 11) , demonstrando que submetido a condições estressantes, o fungo secreta a enzima galactose oxidase.

As atividades enzimáticas intracelulares também foram encontradas elevadas (figuras 10 e 12) e ao serem comparadas no estresse de 40°C com o de 45°C, foi notado que a resposta em 45°C foi mais rápida, pois em 10 minutos de tratamento os níveis da enzima já apareceram aumentados. Em 40°C a enzima retarda seu aparecimento em resposta ao calor, ocorrendo o aumento após 20 minutos de tratamento, porém em maiores tempos apresenta uma maior elevação, em comparação aos controles, que no estresse à 45°C. O aumento do teor enzimático intracelular foi confirmado pela detecção da enzima com anticorpos anti- galactose oxidase, após o fungo receber um choque térmico de 40°C (figura 14).

O fato do fungo responder com mais intensidade ao estresse de 40°C poderia estar relacionado com a sua maior viabilidade nesta temperatura, pois em apenas 10 minutos à 45°C foi observado uma diminuição da taxa de sobrevivência de 85%, indicando que nestas condições o sistema de transporte ou de síntese poderia estar afetado.

Foi observado que o teor de glucose residual, em todos os tempos de exposição, foi similar nos estresses de 40 e 45°C. Desta forma ao ser relacionado o consumo de glucose com a massa celular, poder-se-ia esperar que não houvesse diferenças na massa celular. O crescimento do fungo em todos os tratamentos foi semelhante, evidenciando que o aumento dos níveis da enzima, não seria devido o aumento da massa micelial, mas sim em resposta ao estresse térmico.

A indução de enzimas por estresse térmico tem sido estudada, sendo observado o aumento da peroxidase, em *Neurospora crassa*, quando exposta a altas temperaturas (KAPOOR e LEWIS, 1987a; KAPOOR e SVEENIVASAN, 1988; MACHWE e KAPOOR, 1993). Para explicar o aumento da álcool desidrogenase II em *Zymomonas mobilis* mediante um choque térmico, duas hipóteses foram levantadas por HAEJUNG et al. (1991), uma que ela seria importante para auxiliar o restabelecimento do balanço NADH-NAD após exposição a condições estressantes e outra que ela poderia agir como uma “chaperone” para estabilizar outras enzimas essenciais.

A análise do perfil eletroforético das proteínas intracelulares após o fungo *D. dendroides* ser exposto a temperatura de 40°C (figura 13), não permitiu visualizar proteínas com teores aumentados após o tratamento. Porém, foram observadas proteínas que desapareceram com o choque térmico e apresentaram-se diminuídas nos controles, a medida que se aumentou o tempo de exposição ao calor, indicando uma rápida renovação. A banda correspondente a galactose oxidase padrão não desapareceu demonstrando ser mais estável e o seu peso molecular foi estimado em 72 kDa, confirmando o dado obtido por MENDONÇA e ZANCAN (1987). Quando a enzima foi detectada com anticorpos específicos esta banda mostrou estar aumentada após o choque térmico. Considerando o peso molecular de 72 kDa a galactose oxidase poderia ser incluída na família das *hsp70*, uma vez que seu peso molecular depende de sua glicosilação (MENDONÇA e ZANCAN, 1989). É importante destacar que a função das *hsp70* ainda não está esclarecida (KAPOOR, 1995).

Em resposta ao choque térmico os resultados obtidos mostram que houve aumento da atividade da enzima galactose oxidase intra e extracelular. Apesar dos níveis extracelulares estarem mais altos, não pode ser concluído que esteja havendo apenas sua exportação, pois os níveis intracelulares também foram encontrados aumentados. Para ser esclarecido se o estresse térmico induziu a síntese ou se ativou uma apoenzima, foi realizado um experimento com cicloheximida. O tratamento tanto no estresse à 40°C como à 45°C teve o mesmo perfil de resposta, havendo um aumento na atividade específica da enzima, quando comparado com os controles, porém este aumento não se alterou pela presença da cicloheximida (tabela II).

Considerando que a cicloheximida é um antibiótico que inibe a síntese de proteínas em eucariontes (OBRIG, 1971), se poderia inferir que não houve inibição da síntese proteica e que o aumento observado em condições estressantes não foi resultante da síntese *de novo* da enzima. No entanto, algumas leveduras apresentaram ribossomos insensíveis a cicloheximida, o que poderia indicar que genes estruturais de algumas proteínas ribosomais determinam a sensibilidade do organismo à cicloheximida (TAKAGI et al., 1985). Estes pesquisadores demonstraram que os ribossomos de *Candida maltosa* são modificados durante o cultivo na presença de cicloheximida (25 μ g/ml), tornando-se resistente a altas concentrações. SHATZMAN e KOSMAN (1977) já haviam observado que os níveis de galactose oxidase extracelular não eram afetados quando o fungo era exposto a cicloheximida. Sugerindo esses autores que a enzima era sintetizada previamente e permanecia associada a célula sendo posteriormente liberada no meio. Neste caso

então, tanto os níveis intra como extracelulares não seriam afetados pela presença do inibidor de síntese proteica.

Foi determinada em *N. crassa*, quando tratada com cicloheximida, a expressão de L-aminoácido oxidase, tirosinase e laccase (AISEMBERG et al., 1987; AISEMBERG et al., 1989). O fungo *N. crassa* normalmente não produz a enzima laccase, porém quando tratado com cicloheximida, ocorreu a síntese desta, que foi secretada no meio (FROEHNER e ERIKSSON, 1974). Assim sendo, a cicloheximida pode agir não apenas como inibidor de síntese proteica, mas também como indutor de enzimas. E em baixas doses de cicloheximida não somente envolveu a indução de várias proteínas, relatadas para uma resposta adaptativa em *N. crassa*, como também ao desenvolvimento de tolerância a inibição de síntese de proteínas (GROTEWOLD et al., 1989).

O fungo *Dactylium dendroides* também foi exposto a condições crescentes de peróxido de hidrogênio e foi observado que sua viabilidade decresceu em 50% no tratamento com 1mM de H₂O₂ (figura 15).

A viabilidade dos microrganismos frente à H₂O₂ é muito variável, dependendo do tempo de exposição e da concentração de peróxido de hidrogênio. Assim, em *S. cerevisiae* foi demonstrado o decréscimo da viabilidade em 50%, quando a levedura foi tratada com 10mM de H₂O₂ por 15 minutos (STEELS et al., 1994). DAVIES et al., em 1995, obtiveram 50% de sobrevivência pela exposição da levedura por 2 horas a 0,65 mM de H₂O₂.

O consumo de glucose pelo microrganismo, após 60 minutos de estresse foi determinado e mostrou ser similar em todos os tratamentos, indicando que a massa

celular em média foi constante, sendo a variação dos níveis de proteínas resultante do estresse e não do desenvolvimento micelial.

Foi determinada a atividade enzimática extra e intracelular da galactose oxidase após as células do fungo serem submetidas ao estresse oxidativo, e foi observado o maior aumento da atividade específica da enzima em 4 mM de H₂O₂, tanto para a enzima extra como intracelular (figuras 16 e 17). A variação nos níveis da enzima intracelular foi confirmada pela reatividade com anticorpos específicos (figura 19).

O fato da enzima galactose oxidase extracelular apresentar um aumento mais pronunciado do que a intracelular, em resposta ao peróxido de hidrogênio, confirma experimentos anteriores realizados com a exposição do fungo a altas tensões de oxigênio (PEDROSA e ZANCAN, 1986). Além da galactose oxidase, também a L-amino oxidase teve seus níveis aumentados quando o *Dactylium dendoides* foi exposto a altas tensões de O₂. Neste caso o aumento nos níveis da enzima foi inibido por cicloheximida e por actinomicina D, indicando haver síntese *de novo* da L-amino oxidase (CAVICHOLO e ZANCAN, 1988).

O aumento da galactose oxidase, é semelhante ao observado com a peroxidase em *N. crassa*, que se apresentou aumentada quando aquele fungo foi submetido a H₂O₂ (MACHWE e KAPOOR, 1993). Os autores justificaram o aumento da peroxidase, como mecanismo de defesa, para proteger as células contra danos deletérios provocados por “espécies reativas de oxigênio”-EROS E, em *E. coli* foi reportado a indução de 10 vezes no aumento da síntese de catalase pela presença de H₂O₂ (IMLAY e LINN, 1987). Estas enzimas tem sido encontradas aumentadas

em diferentes microrganismos, quando submetidas a estresse oxidativo, como uma forma de defesa (WATSON, 1990).

A identificação de proteínas induzidas em organismos submetidos a estresse oxidativo tem sido estabelecida, havendo variações de resposta entre as espécies, devido a sensibilidade a variáveis concentrações de H₂O₂, bem como de diferenças de protocolos experimentais.

Em resposta ao estresse oxidativo, neste trabalho foi demonstrado, através de eletroforese SDS-PAGE, uma variação em nove bandas de proteínas (figura 18). Delas a de 31 kDa só apareceu após o estresse. Das bandas que aumentaram a de 64 kDa também foi observada quando foi dado um pulso com ³⁵S-metionina (figura 19). Diferentes autores, trabalharam com diferentes microrganismos e também encontraram variações no teor de proteínas (KAPOOR e LEWIS, 1987b; COLLINSON e DAWES, 1992; JAMIESON et al., 1994; DAVIES et al., 1995 e JAMIESON et al., 1996).

A banda de 26 kDa aumentou em resposta ao estresse oxidativo, esta proteína designada como *hsp26* foi caracterizada em *S. cerevisiae*, estando também presente em células não estressadas (KURTZ e LINDQUIST, 1984). A presença e indução de pequenas *hsp*, como *hsp26*, sugere que esta desempenhe alguma função desconhecida em resposta a estresses (WATSON, 1990).

A galactose oxidase é uma metaloenzima e o cobre é essencial para sua atividade enzimática (AMARAL et al., 1963), a captação de cobre pela enzima é um processo que não depende de energia e não é inibida por cicloheximida, indicando que a síntese de proteína não é requerida para este processo, sendo a galactose oxidase secretada normalmente como uma apoproteína (SHATZMAN e

KOSMAN, 1978). No presente trabalho os estresses foram realizados em meio de cultura cuja composição continha cobre, o que indica que a enzima estava na forma de holoenzima.

SHATZMAN e KOSMAM (1977) estudando o efeito do pH sobre a secreção de galactose oxidase observaram um aumento de sua atividade quando o pH variou de 6.0 para 7.0, os autores atribuíram o aumento a existência de uma proteína previamente sintetizada, já que o fungo tratado com cicloheximida apresentou os mesmos níveis do não tratado, e não observaram incorporação de [³H]-leucina em 24 horas de exposição do fungo ao aminoácido. Quando foi dado um pulso de ³⁵S-metionina no *D. dendroides* não foi observado variação na galactose oxidase (figura 20). Esses dados sugerem que a enzima tenha uma renovação lenta.

O fato dos níveis da galactose oxidase serem semelhantes em presença de cicloheximida e ser detectado o seu aumento por anticorpos específicos, sugere que ela possa existir com uma pró-enzima. McPHERSON et al. (1992) ao clonarem o gene da galactose oxidase mostraram uma sequência não traduzida na proteína nativa determinada por ITO et al. (1991), correspondente a um polipeptídeo com 89 resíduos de aminoácidos. Esta proteína com maior massa molecular poderia ser clivada, conforme as condições fisiológicas, já que a ubiquitina tem seus níveis aumentados pelo choque térmico (LINDQUIST e CRAIG, 1988).

Outra hipótese seria de que existisse um sistema inibitório natural para a enzima que, devido a condições estressantes, fosse proteolizado. Realmente foi identificado um inibidor para a galactose oxidase, um peptídeo com aproximadamente 2 kDa que complexa com o cobre da enzima (MARKUS et al.,

1965; AVIGAD e MARKUS, 1965 e AVIGAD e MARKUS, 1972). Não há estudos sobre a fisiologia desse possível inibidor para que possa ser correlacionado.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a galactose oxidase apresenta seus níveis aumentados quando o fungo foi submetido a estresse térmico e oxidativo. O fato do *Dactylium dendroides* reagir as condições estressantes modificando os teores de galactose oxidase intra e extracelulares sugerem que esta enzima tem papel importante na sobrevivência do fungo.

5. CONCLUSÕES

1. O fungo *Dactylium dendroides*, teve sua viabilidade diminuída quando exposto a temperaturas superiores à 40°C e a concentrações variáveis de H₂O₂.
2. O fungo *Dactylium dendroides*, em resposta aos estresses etanólico, térmico e oxidativo, modificou os níveis da enzima galactose oxidase.
3. A enzima galactose oxidase intracelular teve seus níveis diminuídos após o fungo ser exposto ao etanol.
4. A galactose oxidase intracelular teve seus níveis aumentados após o fungo ser submetido aos estresses térmico e oxidativo.
5. As variações observadas nos níveis intracelulares se refletiram na atividade da galactose oxidase extracelular, em todas as condições estressantes.
6. O aumento dos níveis de galactose oxidase intracelular no fungo exposto ao choque térmico não foi afetado pela presença de cicloheximida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISAKA, K. e TERADA, O. Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*.
Agric. Biol. Chem., Tokyo, v.5, p. 2311-2316, 1981.

AISEMBERG, G.O.; TACCIOLI, G.E.; GROTEWOLD, E. e JUDEWICZ, N.D.
Differential gene expression promoted by cycloheximide in *Neurospora crassa*.
Exp. Mycol., Duluth, v. 11, p. 122-127, 1987.

AISEMBERG, G.O.; GROTEWOLD, E.; TACCIOLI, G.E. e JUDEWICZ, N.D. A
major transcript in the response of *Neurospora crassa* to protein synthesis
inhibition by cycloheximide. **Exp. Mycol.**, Duluth, v. 13, p. 121-128, 1989.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W. e FU, P.C. Enzymatic
determination of total cholesterol. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.20, p. 470-475,
1974.

ALLAN, B.; LINSEMAN, M.; McDONALD, L.; LAM, J.S. e KROPINSKI, A.M. Heat
shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.170,
p.3668-3674, 1988.

AMARAL, D.; BERNSTEIN, L.; MORSE, D. e HORECKER, B.L. Galactose Oxidase
of *Polyporus circinatus*: a Copper Enzyme. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.238,
p.2281-2284, 1963.

AMARAL, D.; KELLY-FALCOZ, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of
Polyporus circinatus. **Meth. Enzymol.**, San Diego, v.9, p. 87-92, 1966.

ARNOSTI, N.D.; SINGER, V.L. e CHAMBERLIN, M.J. Characterization of heat shock
in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 168, p.1243-1249, 1986.

AVIGAD, G.; AMARAL, D.; ASENCIO, C. e HORECKER, B.L. The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.237, p. 2736-2743, 1962.

AVIGAD, G. e MARKUS, Z. Inhibition of galactose oxidase by extracts obtained from the mycelia which produce the enzyme. **Israel J. Chem.**, Jerusalém, v.3, p. 193-196, 1965.

AVIGAD, G. e MARKUS,Z. Identification of a peptide inhibitor of galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. **Fed. Proc.**, Aberdeen, v. 31, p. 447, 1972.

BURNETTE, W.N. "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.112, p. 195-203, 1981.

CAREY, V.C. e INGRAM, L.O. Lipid Composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose. **J. Bacteriol.**, Washington, v.154, p. 1291-1300, 1983.

CAVICHOLO, M.H. e ZANCAN, G.T. Nitrogen and regulation of amine oxidase in *Dactylium dendroides*. **Exp. Mycol.**, Duluth, v. 12, p. 70-76, 1988.

CHARY, P e NATVIG, D.O; Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: Effects of Oxidative Stress, Heat shock and development. **J. Bacteriol.**, Washington, v.171, p. 2646-2652, 1989.

COLLINSON, L.P. e DAWES, I.W. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.138, p. 329-335, 1992.

COOPER, J.A.D.; SMITH, W.; BACILA, M. e MEDINA, H. Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.234, p. 445-448, 1959.

COTTON, M.L. e DUNFORD, H.B. Studies on horseradish peroxidase.XI on the nature of compounds I and II as determined from the kinetics of the oxidation of ferrocyanide. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 51, p. 582-587, 1973.

DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochem. J.**, London, v. 80, p. 547-551, 1961.

DAVIES, J.M.S.; LOWRY, C.V. e DAVIES, J.A. Transient Adaptation to Oxidative Stress in Yeast. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v.317, p. 1-6, 1995.

DEMPEL, B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 25, p. 315-317, 1991.

FARR, B.; TOUATI, D. e KOGOMA, T. Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: Role of HPI catalase. **J. Bacteriol.**, Washington, v.170, p. 1837-42, 1988.

FRACELLA, F.; MOHSENZADEH, S. e RENSING, L. Purification and Parcial Amino Acid Sequence of the Major 70,000-Dalton Heat Shock Protein in *Neurospora crassa*. **Exp. Mycol.**, Duluth, v. 17, p. 362-367, 1993.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicais. **Science.**, Washington, v.201, p. 875-80, 1978.

FROEHNER, S.C. e ERIKSSON, K. Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 120, p. 450-457, 1974.

GROTEWOLD, E.; TACCIOLI, G.E.; AISEMBERG, G.O. e JUDEWICZ, N.D. Early response and induced tolerance to cycloheximide in *Neurospora crassa*. **Curr. Genet.**, Heidelberg, v.15, p. 429-434, 1989.

HAEJUNG, A.N.; SCOPES, R.K.; RODRIGUEZ, M.; KESHAV, K.F. e INGRAM, L.O. Gel Electrophoretic Analysis of *Zymomonas mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes: Identification of Alcohol Dehydrogenase II as a Stress Protein. **J. Bacteriol.**, Washington, v.173, p. 5975-5982, 1991.

IIDA, H. e IYAHARA. A heat shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth. **J. Cell. Biol.**, Ottawa, v.99, p. 1441-1450, 1984.

IMLAY, J.A. e LINN, S. Mutagenesis and stress response induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 2967-2976, 1987.

INGRAM, L.O. e BUTTKE, T.M. Effects of Alcohols on Micro-Organisms. **Adv. Microb. Physiol.**, London, v.25, p.254-302, 1984.

ITO, N., PHILLIPS, S.E.V., STEVENS, C.. OGEL, Z.B., McPHERSON, M.J., KEEN, J.N. YADAV, K.D.S. e KNOWLES, P.F. Novel thioether bond revealed by a 1.7 °A crystal structure of galactose oxidase. **Nature.**,London, v. 350, p. 87-90, 1991

JAMIESON, D.J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptative response to both hydrogen peroxide and mendione. **J. Bacteriol.**, Washington, v.174, p. 6678-81, 1992

JAMIESON, D.J.; RIVERS, S.L. e STEPHEN, W.S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 3277-83, 1994.

JAMIESON, D.J.; STEPHEN, D.W.S. e TERRIÈRE, E.C. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amesterdam, v. 138, p. 83-88, 1996.

KAPOOR, M. A study of the effect of heat shock and metal ions on proteins synthesis in *Neurospora crassa* cells. **Int. J. Biochem.**, Exeter, v.18, p.15-29, 1986.

KAPOOR, M. e LEWIS, J. Heat shock induces peroxidase activity in *Neurospora crassa* and confers tolerance toward oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v.147, p. 904-910, 1987(a).

KAPOOR, M. e LEWIS, J. Alteration of the protein synthesis pattern in *Neurospora crassa* cells by hyperthermal and oxidative stress. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.34, p. 162-168, 1987(b).

KAPOOR, M. e SVEENIVASAN, G.M. The heat shock response of *Neurospora crassa*: stress-induced thermotolerance in relation to peroxidase and superoxide dismutase levels. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 156, p. 1097-1102, 1988.

KAPOOR, M; SVEENIVASAN, G.M.; GOEL, N. e LEWIS, J. Development of Thermotolerance in *Neurospora crassa* by Heat Shock and Other Stresses Eliciting Peroxidase Induction. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 2798-2801, 1990.

KAPOOR, M.; CURLE, C.A. e RUNHAM, C. The hsp70 gene family of *Neurospora crassa*: cloning, sequence, analysis, expression, and genetic mapping of stress-inducible member. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 212-221, 1995.

KURTZ, S. e LINDQUIST, S. Changing patterns of gene expression during sporulation in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 81, p. 7323-7327, 1984.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p. 680-685, 1970.

LEÃO, C. e VAN UDEN. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. and Bioeng.**, New York, v. 24, p. 2601, 1982.

LESTER, G. Inhibition of growth, synthesis and permeability in *Neurospora crassa* by phenethyl alcohol. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 90, p. 29-37, 1965.

LINDQUIST, S. e CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.22, p. 631-677, 1988.

LOWRY, O.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. e RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p 265-275, 1951.

MACHWE, A. e KAPOOR, M. Identification of the heat shock protein of *Neurospora crassa* corresponding to the stress-inductible peroxidase. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, Duluth, v.196, p. 692-698, 1993.

MARKUS, Z.; MILLER, G. e AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. **Appl. Microbiol.**, Washington, v.13, p. 686-693, 1965.

McALISTER, L. e FINKELSTEIN, D.B. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 93, p. 819-824, 1980.

McPHERSON, M.J.; ZUMRUT, B.O.; STEVENS, C.; YADAV, K.D.S.; KEEN, J.N. e KNOWLES, P.F. Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, p. 8146-8152, 1992.

MENDONÇA, M.H. e ZANCAN, G. T. Purification and Characterization of Intracellular Galactose Oxidase from *Dactylium dendroides*. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 252,p. 507-514, 1987.

MENDONÇA, M. H. e ZANCAN, G. T. Intra and Extracellular Forms of Ethanol-Modified O-Underglycosylated Galactose Oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 275, p. 130-139, 1989.

MERIVUORI, H.; MONTENECOURT, B.S. e SANDS, J.A. Ethanol perturbs glycosylation and inhibits hypersecretion in *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.53, p. 463-465, 1987.

MEYER, U.; SCHWEIM, P.; FRACELLA, F. e RENSING, L. Close correlation between Heat Shock response and cytotoxicity in *neurospora crassa* treated with Aliphatic Alcohols and Phenols. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, p. 979-984, 1995.

MICHEL, G.P.F. e STARKA, J. Effect of Ethanol and Heat Stresses on Protein Pattern of *Zymomonas mobilis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.165, p.1040-1042, 1986.

MIYAGUI, D. **Métodos alternativos de purificação e propriedades imunológicas da galactose oxidase de *Dactylium dendroides*.** Curitiba, 1984. 49p. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

NEIDHARDT, F.C.; VANBOGELEN, R.A. e VAUGHN, V. The genetics and regulation of heat shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.18, p. 295-329, 1984.

NELSON, P.D. e KIESON, L.A. Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25 °C (with Molar Extinction Coefficients of Hydrogen Peroxide Solutions in the UV). **Anal. Biochem.**, Duluth, v.49, p. 474-478, 1972.

NELSON, D.R. e KILLEEN, K.P. Heat Shock Proteins of Vegetative and Fruit. *Myxococcus Xanthus* cells. **J. Bacteriol.**, Washington, v.168, p. 1100-1106, 1986.

OBRIG,T.G.; CULP,W.J.; McKEEHAN,W.L. e HARDESTY,B. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 246, p. 174-181, 1971.

PEDROSA, F.O. e ZANCAN, G.T. Effect of oxygen on Galactose Synthesis and Secretion in *Dactylium dendroides*. **Exp. Mycol.**, Duluth, v.10, p. 126-130, 1986.

PEREIRA, I.A. e ZANCAN, G.T. Restriction enzyme fragment patterns of mtDNA from a galactose oxidase-producing mold. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.26, p. 1047-1055, 1993.

PRIVALLE, C.T. e FRIDOVICH, J. Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.84, p.2723-2726, 1987.

ROYCHOWDHURY, H.S. e KAPOOR, M. Ethanol and carbon-source starvation enhance the accumulation of HSP 80 in *Neurospora crassa*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.34, p.162-168, 1988.

ROYCHOWDHURY, H.S. e KAPOOR, M. Heat shock response in *Neurospora crassa*: purification and some properties of HSP 80. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v.68, p.1218-1221, 1990.

SANCHEZ, Y. e LINDQUIST, S.L. HSP104 Required for Induced Thermotolerance. **Science**, Washington, v.248, p. 1112-1115, 1990.

SHATZMAN, A. e KOSMAN, D. Regulation of galactose oxidase synthesis and secretion in *Dactylium dendroides*: effects of pH and culture density. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 130, p. 455-463, 1977.

SHATZMAN, A. e KOSMAN, D. The utilization of copper and its role in the biosynthesis of copper-containing proteins in the fungus, *Dactylium dendroides*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 544, p. 163-179, 1978.

STEELS, E.L.; LEARMONT, R.P. e WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, Reading, v.140, p.569-576, 1994.

STEPHEN, W.S.; RIVERS, S.L. e JAMIESON, D. J. The role of YAP 1 e YAP 2 genes in the regulation of the adaptative oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.16, p. 415-423, 1995.

TAKAGI, M.; KAWAI, S.; TAKATA, Y.; TANAKA, N.; SUNAIRI, M.; MIYAZAKI, M. e YANO. Induction of cycloheximide resistance in *Candida maltosa* by modifying the ribosomes. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, Reading, v. 31, p. 267-275, 1985.

TATUM, E.L.; BARRATT, R.W. e CUTTER, JR. V.M. Chemical Induction of Colonial Paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*. **Science**, Washington, v. 109, p. 509-511, 1949.

VANBOGELEN, R.A.; KELLEY, P.M. e NEIDHARDT, F.C. Differential Induction of Heat Shock, SOS, and Oxidation Stress Regulons and Accumulation of Nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.169, p. 26-32, 1987.

VOGEL, A.I. Analysis of hydrogen peroxide. In: **Quantitative Inorganic Analysis**. London, 2nd ed. Richard Clay and Company Ltda, 1951, p.283.

WATSON, K. Microbial Stress Protein. In: ROSE, A.H. e TEMPEST, D.W. **Adv. in Microb. Physiol.** London: Acad. Press, 1990. v.31, p. 183-223.

YURA, T.; NAGAI, H.; MORI, H. Regulations of the shock response in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, Paulo Alto, v.47, p. 321-350, 1993.

ZEUTHEN, M.L.; DABROWA, N.; ANIEBO, C.M. e HOWARD, D.H. Ethanol tolerance and the induction of stress proteins by ethanol in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 134, p. 1375-1384, 1988.