

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Faculdade de Medicina – FM

Pós-Graduação em Patologia Molecular

ROBSON WILLIAN DE MELO MATOS

**O SISTEMA CELULOLÍTICO DE *Penicillium echinulatum*: ANÁLISE
DA ULTRAESTRUTURA MICELIANA E INFLUÊNCIA DE
MODULADORES EPIGENÉTICOS**

Brasília - DF

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Faculdade de Medicina – FM

Pós-Graduação em Patologia Molecular

ROBSON WILLIAN DE MELO MATOS

**O SISTEMA CELULOLÍTICO DE *Penicillium echinulatum*: ANÁLISE
DA ULTRAESTRUTURA MICELIANA E INFLUÊNCIA DE
MODULADORES EPIGENÉTICOS**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia Molecular, da
Faculdade de Medicina, da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de mestre em
Patologia Molecular.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças
Fonseca**

Brasília, DF

2012

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular, da Universidade de
Brasília (UnB), sob a orientação do Prof.
Marcio José Poças Fonseca.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Departamento de Genética e Morfologia (GEM/IB)
Universidade de Brasília- UnB

Orientador:

Dr. Marcio José Poças Fonseca
Departamento de Genética e Morfologia (GEM/IB)
Universidade de Brasília – UnB

Suplente:

Dra. Ildinete Silva Pereira
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Universidade de Brasília – UnB

“Feliz daquele que encontra um
amigo digno desse nome.”

(Menandro)

“Quem supera, vence.”

(Johann Wolfgang von Goethe)

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo muitos agradecimentos aos meus pais, Roberto e Antonieta (*in memoriam*), e aos meus irmãos, Rodrigo e Rogério, pelo amor, carinho e atenção. Peço desculpas a todos pelos meus destemperos ocasionais e pelas minhas ausências. Este trabalho é para vocês!

Agradeço a todos os meus familiares pelo apoio e pela torcida.

Aos meus grandes irmãos: Eduardo, João, Guilherme, Stephanie e Natália, amigos de hoje e de sempre. Amigos que nunca me negaram apoio e carinho. Muito obrigado por tudo!

À Natália Angarten, por ser essa pessoa que tanto me inspira e pela qual guardo tanta admiração. Muito obrigado pela ajuda, pelo carinho, pelo amor, pelo apoio e por sempre estar presente, nos momentos doces e amargos dessa vida.

Agradeço todo o apoio, carinho e ajuda do meu grande amigo Marciano Régis Rubini. Desde o começo, sempre esteve comigo me ensinando e me aconselhando sobre a vida, dentro e fora do laboratório. No início, meu colega de laboratório; agora, meu irmão.

Ao Prof. Marcio José Poças Fonseca, pela oportunidade e confiança para me aceitar como seu aluno. Agradeço pela atenção, apoio e todo o universo de conhecimentos que adquiri no âmbito profissional, acadêmico e pessoal. Espero não ter dado muito trabalho!

À Profa. Ildinete da Silva Pereira e Profa. Cynthia Maria Kyaw, pelas palavras amigas, o carinho e os constantes intercâmbios musicais.

A todos os professores do Laboratório de Biologia Molecular, por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar.

À Profa. Sônia Bão e ao Prof. Edivaldo Ximenes, pela ajuda e atenção.

Aos amigos Rafael Burtet e Camilo, por compartilharem suas experiências, por serem meus amigos, por me ajudarem demais.

À grande amiga Érika Kioshima, por ser uma das pessoas mais doces que já conheci na vida. Muito obrigado por me ouvir, por rirmos juntos e por estar sempre disposta a ajudar.

À Luciana Pereira, pela amizade, carinho e toda a paciência e senso de humor para aguentar as minhas cantorias nos feriados e finais de semana no laboratório.

Agradeço todo o apoio, ajuda, dedicação e carinho de toda a galera do LabMOA: Daniel, Lorena, Thiago, Fabiana, Marciano, Calliandra, Miguel, Eveline, Marília, Sâmia, Tatiane, Natália, Amanda, Nathália, Fernanda, Luana, Thaís, Ricardo, Raphael, Patrícia e, em especial, Bárbara Paes, minha fiel Padawan e cobaia das minhas tentativas de orientar alguém. Vocês são especiais!

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular: Fátima, Ivanildes e Thompson, pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos alunos do Laboratório de Microscopia Eletrônica: Raphael, Felipe, Ingrid, Nathália, Renata e Lauro, por me ensinarem a trabalhar com microscopia eletrônica.

Aos vizinhos do andar de baixo: Gilvan, Leonora, Carol, Paula Istvan, Paula Jaramillo e Antonielle, por toda a ajuda e dedicação.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Conversão de biomassa para biocombustíveis – O Etanol de 2ª Geração	1
1.2 – Estrutura da celulose	3
1.3 – Celulase de fungos	6
1.4 – O gênero <i>Penicillium</i>	9
1.5 – Celulasas e xilanases do gênero <i>Penicillium</i>	11
1.6 – <i>Penicillium echinulatum</i>	15
1.7 – A Herança Epigenética e Fungos	18
1.8 – Substâncias capazes de alterar a conformação da cromatina	20
1.8.1 – 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA)	20
1.8.2 – Tricostatina A	22
1.8.3 – Butirato de Sódio (NaBut)	24
1.9 - Análise de fungos produtores de celulasas e xilanases por microscopia eletrônica	25
2 – OBJETIVOS	30
2.1 – Objetivo Geral	30
2.2 – Objetivos Específicos	30
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 – Microrganismo	31
3.2 - Soluções e meios utilizados para o cultivo de <i>P. echinulatum</i>	31
3.2.1 – Meio ágar-dextrose-batata (BDA) para produção de conídios de <i>P. echinulatum</i>	31
3.2.2 – Solução de elementos traço	31
3.2.3 – Solução de sais	31
3.2.4 – Meio mínimo para cultivo na presença de drogas remodeladoras da cromatina	32
3.2.5 – Celulose intumescida (2,5%)	32
3.2.6 – Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (repressão enzimática)	32
3.2.7 – Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (indução enzimática)	32
3.2.8 – Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de varredura	33
3.2.9 – Solução de ampicilina 50mg/mL (estoque)	33
3.2.10 – Tampões e soluções para corrida de gel de agarose	33

3.2.11 – Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	34
3.2.12 – Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (DNS)	35
3.3 – Microscopia eletrônica de varredura	36
3.4 – Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão de celulases de <i>P. echinulatum</i>	37
3.5 – Microscopia eletrônica de transmissão	38
3.6 – Drogas modificadoras da estrutura da cromatina	40
3.7 – Teste de crescimento de <i>P. echinulatum</i> com drogas modificadoras da estrutura da cromatina	40
3.8 – Análise do efeito de drogas modificadoras da estrutura da cromatina sobre a expressão de celulases de <i>P. echinulatum</i>	40
3.9 – Ensaio enzimáticos	41
3.10 – Precipitação de proteínas de <i>P. echinulatum</i>	42
3.11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante - SDS-PAGE	43
3.12 – Análise estatística dos dados	44
4 – RESULTADOS	45
4.1 – Análise de <i>P. echinulatum</i> por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura	45
4.1.1 – Cultivo de <i>P. echinulatum</i> sobre bagaço de cana-de-açúcar	47
4.2 – Efeito da fonte de carbono sobre a expressão de genes do complexo celulolítico de <i>P. echinulatum</i>	50
4.3 – Análise de <i>P. echinulatum</i> por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão	52
4.4 – Testes de crescimento na presença de drogas moduladoras da estrutura da cromatina	54
4.5 – Efeito de moduladores epigenéticos sobre o nível de transcritos de genes do complexo celulolítico de <i>P. echinulatum</i>	56
4.6 – Ensaio enzimáticos	61
4.6.1 – Ensaio de FPase	61
4.6.2 – Ensaio de CMCase	62
4.6.3 – Ensaio de Xilanase Total	64
5 – DISCUSSÃO	67
6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	74
7 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESSA DISSERTAÇÃO	76
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMO

Neste trabalho foi analisado, por microscopia eletrônica de varredura, o crescimento do fungo filamentosso *Penicillium echinulatum* sobre bagaço de cana-de-açúcar e características morfológicas foram descritas. Essa espécie apresentou hifas ramificadas e com septação. Os conídios apresentaram formato globoso a subgloboso e diâmetro entre 3,5 a 5µm. O crescimento do microrganismo sobre o bagaço causou a ruptura parcial desse substrato, observada a partir do aspecto quebradiço e esfarelado das fibras, assim como pela propagação das hifas entremeando as fibrilas.

Por meio de estudos de qRT-PCR, foi comparado o nível de acúmulo de transcritos dos genes *egl*, *cbh*, *bgl* e *swo* de *P. echinulatum*, cultivado em condições indutoras ou repressoras para genes do complexo celulolítico e em diferentes tempos de crescimento. Em condição indutora, esse fungo apresentou um pico de acúmulo de transcritos dos genes *egl*, *cbh* e *swo*, após 48h de cultivo. Após 24h, foi observado por microscopia eletrônica de transmissão alterações ultraestruturais condizentes com células com elevada função de produção e secreção de proteínas. O gene *bgl*, por sua vez, não apresentou indução do nível de transcritos comparável aos demais genes, mesmo quando cultivado em fonte celulósica.

A análise quantitativa do acúmulo de transcritos desses genes também foi investigada na presença de drogas com ação inibitória da atividade de histonas desacetilases (Tricostatina A - TSA e butirato de sódio - NaBut), ou inibidoras da atividade de DNA metiltransferases (5-aza-2'-deoxicitidina – 5-AZA). A droga 5-AZA não causou alteração do acúmulo de transcritos de genes de celulasas. Com as drogas NaBut e TSA, observou-se a redução do nível de transcritos para os genes *egl*, *swo* e *cbh*, em comparação a condição controle (ausência de droga). Utilizando-se concentrações menores desses dois compostos, somente foi observada a redução do acúmulo de transcritos dos genes *egl* e *swo* sob a ação de TSA. Não foi observada influência dos moduladores epigenéticos sobre a atividade enzimática dos sobrenadantes de culturas desse fungo sobre substratos celulósicos. Adicionalmente, o perfil proteico dos sobrenadantes de cultura não apresentou alteração sob efeito dessas drogas.

Palavras chave: *Penicillium echinulatum*, celulasas, xilanasas, epigenética, qRT-PCR, microscopia eletrônica, Tricostatina A, butirato de sódio e 5-aza-2'-deoxicitidina.

ABSTRACT

Penicillium echinulatum morphological characteristics and its growth on sugarcane bagasse were evaluated by scanning electron microscopy. This species presented septated and branched hyphae. *P. echinulatum* conidia presented globose/subglobose shape and diameter between 3.5 and 5µm. The growth of this microorganism on sugarcane bagasse caused partial rupture of the substrate structure.

The influence of different carbon sources (swollen cellulose or glucose) on the accumulation of transcripts of *bgl*, *egl*, *swo* and *cbh* genes were determined using real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Under induction conditions, transcription of *egl*, *cbh* and the *swo* genes was hyper induced after 48h incubation. On the other hand, the transcription of *bgl* gene was not induced to the same level of the other genes, even under induction conditions. Moreover, after 24h, mycelial ultrastructure revealed features of a typical protein production and secretion cell.

The impact of epigenetic modifiers Trichostatin A (TSA), sodium butyrate (NaBut) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) on the transcription of *bgl*, *egl*, *swo* and *cbh* genes were determined using qRT-PCR. The level of *P. echinulatum* cellulase transcripts was not altered by 5-AZA. On the other hand, TSA and NaBut reduced *egl*, *swo* and *cbh* transcripts levels in comparison with the control condition (drug absence). Lower concentrations of these two compounds were used and only TSA had effect on transcripts levels of *egl* and *swo* genes. No difference in enzyme activity towards cellulosic substrates and also in the secreted proteins electrophoretic profile was observed under the influence of these epigenetic modifiers.

Keywords: *Penicillium echinulatum*, cellulases, xylanases, epigenetics, qRT-PCR, electron microscopy, Trichostatin A, sodium butyrate and 5-aza-2'-deoxycytidine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado do modelo de biorefinaria	2
Figura 2. Esquema do efeito do pré-tratamento sobre material lignocelulósico	3
Figura 3. Representação esquemática da parede celular vegetal primária	4
Figura 4. Estrutura química da cadeia de celulose	4
Figura 5. Representação das ligações de hidrogênio intra e intercadeias do polímero de celulose	5
Figura 6. Representação esquemática da fibrila de celulose	5
Figura 7. Representação esquemática do modo de ação de celulases e swolenina	7
Figura 8. Eletromicrografias de varredura de amostras de papel de filtro em duas distintas magnificações e diferentes tratamentos	8
Figura 9. Estrutura da xilana	12
Figura 10. Representação esquemática dos conídios e conidióforos de <i>P. echinulatum</i>	16
Figura 11. Filogenia das linhagens mutantes de <i>P. echinulatum</i>	17
Figura 12. Estrutura química da 5-aza-2'-deoxicitidina e da citidina	21
Figura 13. Mecanismo reacional da metilação de citosinas	21
Figura 14. Mecanismo proposto por Santi <i>et al</i> (1983) para a ação da 5-aza-2'-deoxicitidina	22
Figura 15. Estrutura química da molécula de Tricostatina A	22
Figura 16. Representação esquemática das interações entre a enzima histona desacetilase-like de <i>Aquifex aeolicus</i> e a molécula de TSA	24
Figura 17. Estrutura química da molécula de butirato de sódio	25
Figura 18. Eletromicrografias de varredura de uma amostra de polpa kraft de eucalipto não submetida a tratamento algum ou quando tratado com xilanase de <i>Streptomyces</i> sp.	26
Figura 19. Eletromicrografia de varredura demonstrando o crescimento do micélio de <i>Streptomyces</i> sp. sobre uma amostra de polpa Kraft de eucalipto	27
Figura 20. Eletromicrografias de varredura de amostras de polpa de bagaço	27
Figura 21. Eletromicrografia de varredura (100x) de um tecido misto composto por poliéster/algodão tratado, ou não, com celulases para a remoção de fibras de algodão	28
Figura 22. Eletromicrografias de varredura de cortes transversais de fibra de algodão	29
Figura 23. Eletromicrografia de transmissão de uma fibra de algodão tratada com endoglicanase V	29
Figura 24. Curva padrão de xilose utilizada para medir a quantidade de açúcares redutores no ensaio enzimático de xilanase total	42
Figura 25. Curva padrão de glicose utilizada para medir a quantidade de açúcares redutores nos ensaios enzimáticos de FPase e CMCase	42
Figura 26. Eletromicrografia de varredura dos esporos de <i>P. echinulatum</i> crescido em meio BDA	45
Figura 27. Eletromicrografia de varredura dos conídios em processo de germinação e de hifas de <i>P. echinulatum</i>	46
Figura 28. Eletromicrografia de varredura do micélio de <i>P. echinulatum</i>	46
Figura 29. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	48
Figura 30. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> incubado com conídios de <i>P.echinulatum</i> pelo período de 120h	48
Figura 31. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> incubado com conídios de <i>P.echinulatum</i> pelo período de 192h	48
Figura 32. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor	49

Figura 33. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor incubado com conídios de <i>P.echinulatum</i> pelo período de 120h	49
Figura 34. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor incubado com conídios de <i>P.echinulatum</i> pelo período de 192h	49
Figura 35. Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes <i>egl</i> e <i>cbh</i> de <i>P. echinulatum</i> por qRT-PCR, cultivo com celulose intumescida 1%	51
Figura 36. Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes <i>swo</i> e <i>bgl</i> de <i>P. echinulatum</i> por qRT-PCR, cultivo com celulose intumescida 1%	52
Figura 37. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de <i>P. echinulatum</i> cultivadas em glicose 3% ou celulose intumescida 1% pelo período de 24h	53
Figura 38. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de <i>P. echinulatum</i> cultivadas em glicose 3% ou celulose intumescida 1% pelo período de 72h	53
Figura 39. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de <i>P. echinulatum</i> cultivadas em glicose 3% ou celulose intumescida 1% pelo período de 144h54	54
Figura 40. Análise de crescimento do fungo <i>P. echinulatum</i> em cultura sólida na presença de drogas modificadoras da estrutura da cromatina	55
Figura 41. Análise comparativa do peso úmido micelial de <i>P. echinulatum</i>	56
Figura 42. Quantificação comparativa do nível dos transcritos dos genes <i>egl</i> , <i>cbh</i> , <i>bgl</i> e <i>swo</i> de <i>P. echinulatum</i> por qRT-PCR entre os cultivos com BCA e glicose na presença de moduladores epigenéticos (maiores concentrações utilizadas)	58
Figura 43. Quantificação comparativa do nível dos transcritos dos genes <i>egl</i> , <i>cbh</i> , <i>bgl</i> e <i>swo</i> de <i>P. echinulatum</i> por qRT-PCR entre os cultivos com BCA e glicose na presença de moduladores epigenéticos (menores concentrações utilizadas)	60
Figura 44. Ensaio de atividade de FPase dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (bagaço de cana 0,1%)	62
Figura 45. Ensaio de atividade de FPase dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (glicose 2%)	62
Figura 46. Ensaio de atividade de CMCase dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (bagaço de cana 0,1%)	63
Figura 47. Ensaio de atividade de CMCase dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (glicose 2%)	63
Figura 48. Ensaio de atividade de xilanase total dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (bagaço de cana 0,1%)	64
Figura 49. Ensaio de atividade de xilanase total dos sobrenadantes de cultura de <i>P. echinulatum</i> (glicose 2%)	64
Figura 50. Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de amostras do sobrenadante do cultivo de <i>P. echinulatum</i> em bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor 0,1%	66
Figura 51. Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de amostras do sobrenadante do cultivo de <i>P. echinulatum</i> em glicose 2%	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Penicillium</i> analisadas quanto à produção de xilanases.....	13
Tabela 2. Lista de iniciadores sintéticos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.	38
Tabela 3. Reagentes utilizados para a preparação de gel de SDS-PAGE.....	43

I – INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conversão de biomassa para biocombustíveis – O Etanol de 2ª Geração

O crescente uso de petróleo e seus derivados têm impulsionado numerosos esforços para a redução de sua dependência. Estima-se que nos últimos 50 anos, o consumo global desses combustíveis foi triplicado (Lovins *et al.*, 2004). Atualmente, essas fontes fósseis representam 55% do consumo mundial de energia (BNDES, 2008). Projeta-se que o crescimento da demanda energética mundial será superior a 50% até o ano 2025 devido ao rápido crescimento das nações atualmente em desenvolvimento (Ragauskas, 2006).

Outro fator preocupante é a questão ambiental. Os governos que compõem a União Européia e o Departamento de Energia Estadunidense fixaram metas para substituir parte do uso do petróleo veicular por biocombustíveis e a troca gradual de produtos químicos de origem fóssil por derivados de biomassa até o ano de 2025. Essas ações têm como objetivo diminuir a emissão de gases do efeito estufa (Hoffert *et al.*, 2002; Ragauskas *et al.*, 2006). A reciclagem da biomassa vegetal visa também solucionar outro problema: o acúmulo de resíduos lignocelulósicos após colheitas e processamento da biomassa. Estima-se que 731 megatoneladas de palha de arroz sejam produzidas anualmente no mundo – quantidade suficiente para produzir 205 gigalitros de bioetanol por ano (Kim & Dale, 2004). No Brasil, o processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol e açúcar gera o bagaço, frequentemente sujeito à queima para a geração de energia em usinas. Constituído de 40-50% por celulose (revisto por Sun *et al.*, 2004), o bagaço de cana-de-açúcar é considerado uma das fontes celulósicas de maior potencial para a produção de bioetanol e celulases (BNDES, 2008).

Uma estratégia proposta para fortalecer a segurança energética mundial de modo sustentável é a distribuição da produção de energia de maneira multifacetada. Isto é, utilizar métodos de geração comuns (queima de combustíveis fósseis, energia nuclear, etc.) aliados a fontes consideradas atualmente como alternativas (Hoffert *et al.*, 2002). Entre estas, o uso da biomassa vegetal mostra-se uma fonte energética renovável, de baixo custo e pouco poluente.

Com a finalidade de se aproveitar todo o potencial energético da biomassa vegetal, o conceito de biorefinaria expande-se mundialmente (Ragauskas, 2006). Esse conceito refere-se ao aproveitamento da biomassa vegetal para a extração/produção de produtos químicos,

produção de biocombustíveis e energia (Figura 1). A biomassa vegetal apresenta-se como um substituto para o petróleo sendo uma alternativa renovável e de baixo custo, uma vez que as biorefinarias utilizariam como substrato, resíduos lignocelulósicos de colheitas, da indústria de papel e de desmatamento (Wyman, 2003).

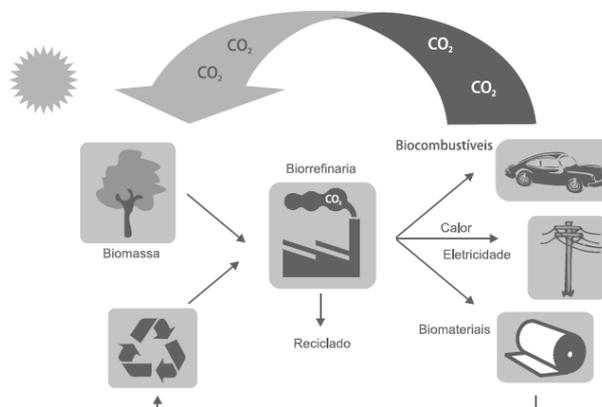


Figura 1. Diagrama simplificado do modelo de biorefinaria (adaptado de Ragauskas *et al.*, 2006). Extraído de BNDES (2008).

Devido ao custo ainda não comercialmente competitivo, a instalação de biorefinarias ainda não é interessante em comparação às refinarias tradicionais. Por conseguinte, diversas abordagens têm sido investigadas para a redução dos custos de produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. Uma delas é o aumento da quantidade final de biomassa disponível por meio da manipulação de genes de vegetais (Van Camp, 2005).

O processo de conversão da biomassa para etanol é constituído de várias etapas. Primeiramente, a biomassa vegetal é submetida a um pré-tratamento físico e/ou químico que tem como objetivo remover qualquer impedimento estrutural e composicional, inerente ao substrato, à ação de enzimas hidrolíticas (Figura 2). Após essa etapa, a matéria vegetal adquire maior superfície de contato e homogeneidade, requisitando menor tempo e quantidade de enzimas utilizadas para o processo de sacarificação dos polímeros que compõem a parede celular vegetal (Knauf & Moniruzzaman, 2004). Por último, é realizada a fermentação dos açúcares formados na etapa anterior e a separação dos produtos de interesse (Mosier *et al.*, 2005).

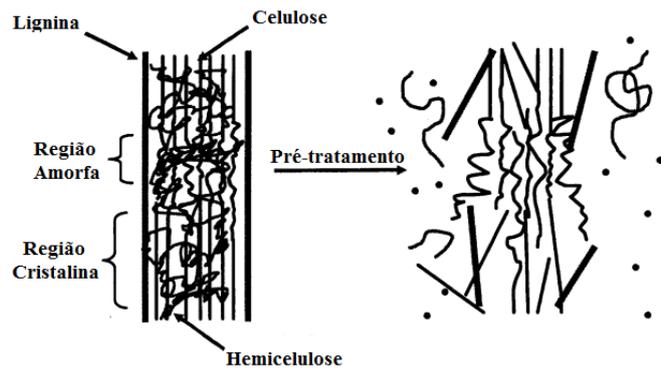


Figura 2. Esquema do efeito do pré-tratamento sobre material lignocelulósico (adaptado de Hsu *et al.*, 1980)

Presentemente, o fator limitante para a implantação, em escala industrial, da tecnologia de produção do etanol lignocelulósico é o elevado custo da etapa de conversão dos polímeros que constituem a parede celular vegetal em suas unidades monoméricas. Esse custo está diretamente relacionado à produção de enzimas hidrolíticas em grande quantidade e que sejam resistentes às variações físico/químicas impostas ao longo do processo de produção. Deste modo, a descoberta de novas enzimas e o entendimento de seus mecanismos regulatórios é de interesse científico e comercial.

1.2 Estrutura da celulose

A parede celular vegetal consiste principalmente de um complexo arranjo de polissacarídeos de elevada massa molecular, por exemplo, celulose, hemicelulose e pectina, além de proteínas e lignina (Figura 3) (revisto por Carpita & Gibeaut, 1993). A parede celular vegetal conecta as células para a formação de tecidos, promove a sinalização celular para fenômenos tais como crescimento e divisão celular, proporciona forma, rigidez e proteção às células vegetais (revisto por Lodish *et al.*, 2000).

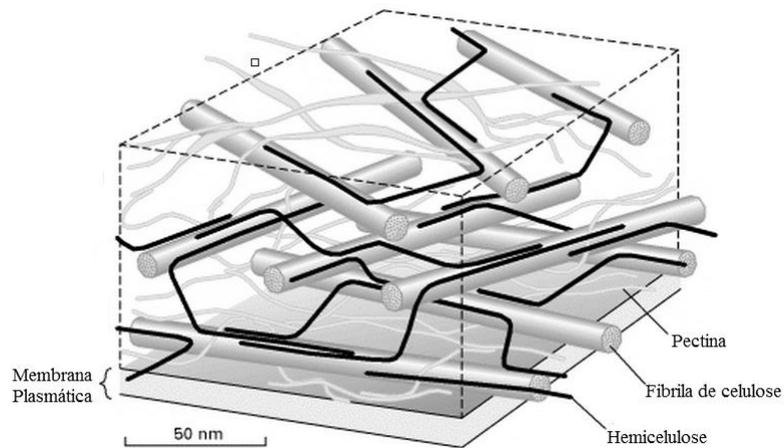


Figura 3. Representação esquemática da parede celular vegetal primária (adaptado de Lodish *et al.*, 2000).

Embora haja diferenças marcantes na composição da parede celular em diferentes tecidos e espécies vegetais, a celulose destaca-se como seu principal polissacarídeo e, conseqüentemente, biopolímero de maior abundância na natureza. Sua estrutura é formada linearmente por unidades de D-glicose (grau de polimerização: 2000 a 15000 resíduos) unidas covalentemente por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. A unidade repetitiva da celulose é formada pelo dissacarídeo celobiose. O final da cadeia de glicana com um carbono anomérico não ligado a outro resíduo de glicose é caracterizada como extremidade redutora do polímero. A extremidade oposta é denominada de extremidade não-redutora (Figura 4) (Sandgren *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010).

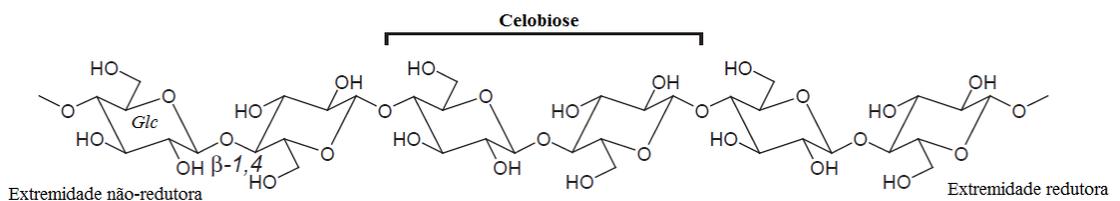


Figura 4. Estrutura química da cadeia de celulose (adaptado de Sandgren *et al.*, 2005).

Após a sua síntese, dezenas de cadeias de celulose são organizadas paralelamente formando uma estrutura fibrilar cristalina, mantida por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, interações hidrofóbicas e forças de van de Waals. A grande densidade de interações intermoleculares, particularmente ligações de hidrogênio, contribui de maneira expressiva para a rigidez e grau de cristalinidade do polímero (Figura 5). Cada microfibrila

apresenta largura aproximada de 3nm por vários μm de comprimento, o suficiente para envolver a membrana celular diversas vezes. (Sandgren *et al.*, 2005; Cosgrove, 2005).

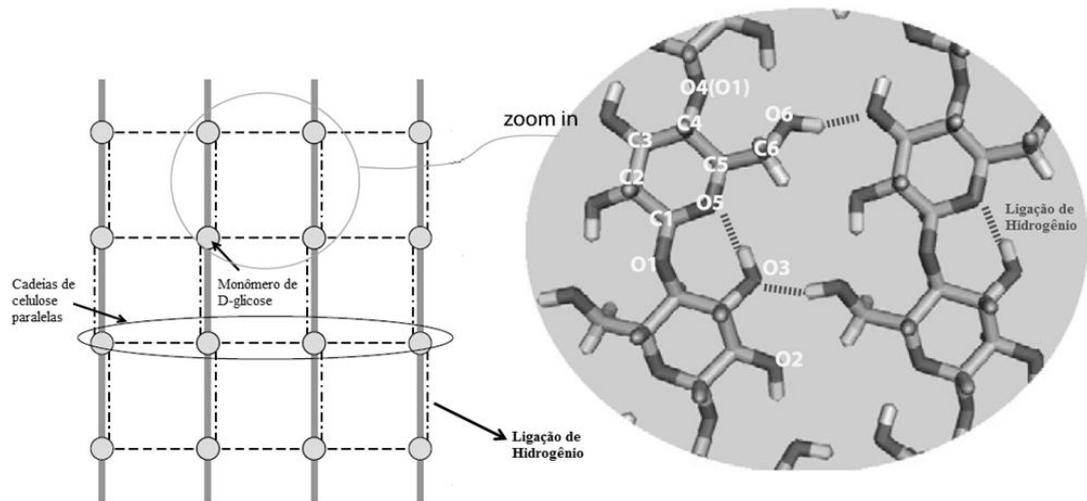


Figura 5. Representação das ligações de hidrogênio intra e intercadeias do polímero de celulose (adaptado de Shen & Gnanakaran, 2009).

As regiões cristalinas das microfibrilas de celulose são entremeadas por regiões molecularmente menos organizadas, denominadas regiões amorfas (Figura 6). Portanto, o grau de cristalinidade das fibrilas de celulose é variável entre tecidos e espécies vegetais. (revisto por Béguin & Aubert, 1994).

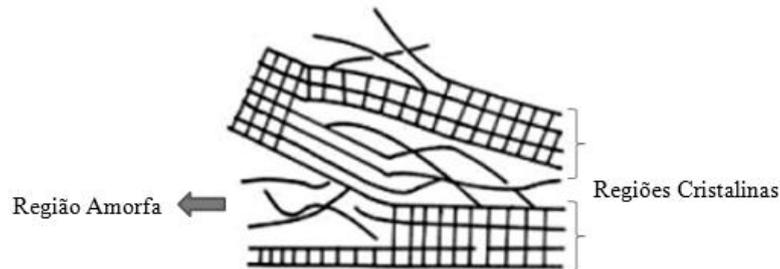


Figura 6. Representação esquemática da fibrila de celulose (adaptado de Klemm *et al.*, 2005).

Como dito anteriormente, a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é de grande importância para o aumento do rendimento das reações de hidrólise enzimática da celulose. Isto se deve ao fato de que essas reações são limitadas pelas propriedades físicas do polímero, tais como: grau de polimerização, acessibilidade e cristalinidade (revisto por Kumar & Wyman, 2009; revisto por Alvira *et al.*, 2010).

A acessibilidade ao polímero, determinada pelo tamanho da partícula de celulose (área de contato externa) e porosidade (área de contato interna), é o fator mais importante para a hidrólise. Esse fator reflete a superfície de contato total entre as enzimas e substrato, influencia a adsorção de celulasas e a taxa e extensão das reações enzimáticas (revisto por Arantes & Saddler, 2011).

O grau de cristalinidade das fibrilas também é admitido como uma medida de recalcitrância do polímero. Isto é, celulosas com maior densidade de regiões amorfas apresentam maior reatividade química e melhor acessibilidade para interações enzimáticas. (revisto por Béguin & Aubert, 1994; revisto por Klemm *et al.*, 2005).

1.3 Celulasas de fungos

Fungos filamentosos são grandes produtores de enzimas hidrolíticas extracelulares. Em um estudo pioneiro, Mandels & Sternberg (1976) isolaram 14000 espécies de fungos com capacidade celulolítica. Tal produção possibilita a esses organismos utilizarem polissacarídeos vegetais complexos como fonte de carbono. Por possuírem tal capacidade, fungos são organismos importantes para o equilíbrio da natureza por sua atuação na reciclagem de diversos compostos orgânicos (Ilmén *et al.*, 1997).

Celulasas são produzidas por diversas espécies de ascomicetos (ex.: *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Aspegillus* sp.), basidiomicetos (ex.: *Phanerochaete chrysosporium*), fungos da podridão parda (ex.: *Fomitopsis palustris*) e algumas espécies anaeróbias (ex.: *Orpinomyces* sp.) – responsáveis pela degradação de celulose no trato gastrointestinal de ruminantes (Galbe & Zacchi, 2002; Dashtban *et al.*, 2009).

As celulasas compreendem um grupo de enzimas capazes de romper as ligações glicosídicas que compõem o polímero de celulose (β 1 – 4). Pertencentes ao diverso grupo das glicosil hidrolases (EC 3.2.1), essas enzimas possuem enorme potencial para aplicação na indústria alimentícia, produção de cervejas, vinhos, papel, detergentes, ração animal, tratamento de têxteis e para a produção de biocombustíveis (revisto por Galbe & Zacchi, 2002; revisto por Wilson, 2009).

A degradação da celulose é promovida pela ação sinérgica de três grandes classes de enzimas extracelulares: endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases ou celobiohidrolases (EC

3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Juntamente, essas enzimas são capazes de hidrolisar a celulose em oligossacarídeos menores e, finalmente, glicose. Endoglicanases são enzimas que catalisam a clivagem randômica de ligações glicosídicas internas de regiões amorfas da cadeia de celulose, levando à produção de novas extremidades na cadeia para a ação de celobiohidrolases. Estas, por sua vez, atuam clivando as ligações glicosídicas a partir das extremidades reductoras e não-reductoras da cadeia, liberando monômeros ou celobiose como produtos principais. As β -glicosidases finalizam o processo de sacarificação por meio da hidrólise das ligações glicosídicas das moléculas de celobiose e de outros oligossacarídeos para a formação de monômeros de glicose (Figura 7) (Ilmén *et al.*, 1997).

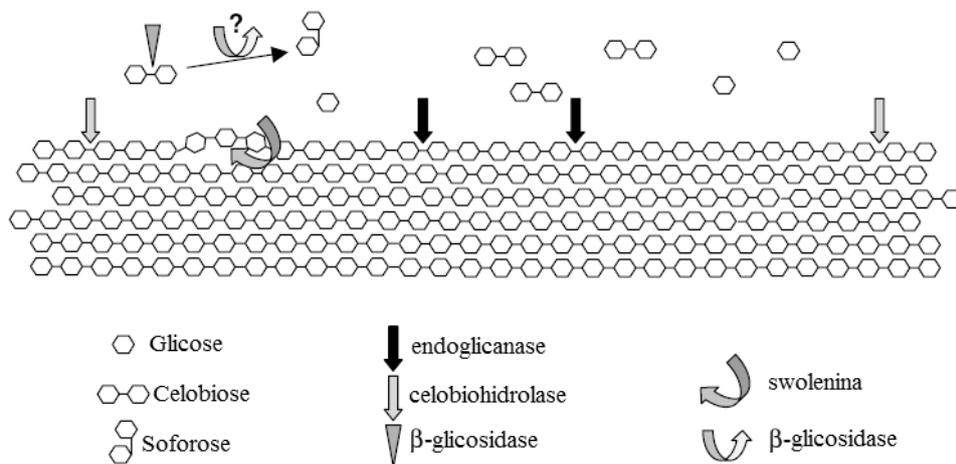


Figura 7. Representação esquemática do modo de ação de celulases e swolenina (adaptado de Aro *et al.*, 2005).

Recentemente descoberta em espécies de *Trichoderma* e, posteriormente, em *Aspergillus*, a proteína amorfogênica de parede celular vegetal, denominada swolenina, auxilia no processo de degradação enzimática do polímero de celulose (Figura 7 e 8) (Saloheimo *et al.*, 2002; Brotman *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010a).

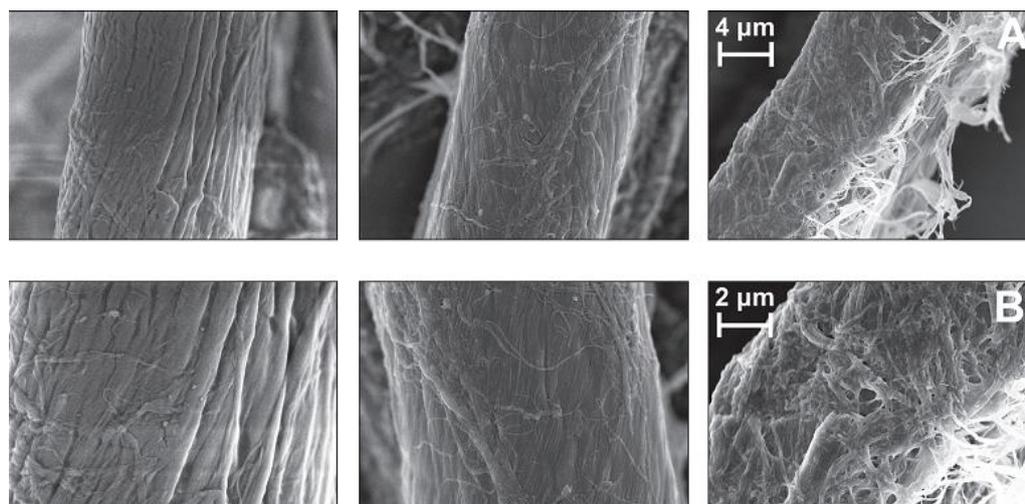


Figura 8. Eletromicrografias de varredura de amostras de papel de filtro em duas distintas magnificações (a, b) e diferentes tratamentos. Na coluna da esquerda, o substrato foi incubado somente com tampão acetato 0,05M pH 4,8. Na coluna central, BSA ($[] = 6\mu\text{mol/L}$). Na coluna da direita, Swolenina de *Kluyveromyces lactis* ($[] = 5\mu\text{mol/L}$). Todas as amostras foram incubadas por 48h à 45°C (adaptado de Jäger *et al.*, 2011).

A swolenina possui elevada similaridade de sequência de resíduos de aminoácidos com as expansinas (Saloheimo *et al.*, 2002). As expansinas constituem uma superfamília de proteínas vegetais com capacidade de afrouxar a estrutura da parede celular vegetal e são de essencial importância para o crescimento de plantas e diversos processos fisiológicos (Sampedro & Cosgrove, 2005). Semelhantemente às expansinas, acredita-se que a swolenina não possua atividade sobre as ligações glicosídicas presentes na celulose, pois não se observa a formação de açúcares redutores mediante sua atividade em diversos substratos celulósicos (Saloheimo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2008). Propõe-se que a swolenina promova o intumescimento da parede celular vegetal por meio do rompimento das ligações de hidrogênio intra e intercadeias de celulose, facilitando o acesso de enzimas hidrolíticas (Arantes e Saddler, 2010).

A produção de celulases por fungos é regulada principalmente no nível transcricional e ocorre basicamente em três estados: expressão basal, expressão massiva pela presença de indutores e a repressão da expressão por catabólitos (revisto por Aro *et al.*, 2005). Fungos celulolíticos devem reconhecer de alguma maneira a presença de celulose antes de iniciar a expressão de celulases em grande quantidade. Para esse fim, acredita-se que celulases constitutivas sejam expressas em pequenas quantidades para iniciar a degradação da celulose, gerando indutores solúveis que podem entrar na célula e ativar a transcrição massiva de diversos genes de celulases. A repressão catabólica das celulases é um fenômeno observado

na presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis (ex.: glicose) (Ilmén *et al.*, 1997). Esse mecanismo de repressão catabólica é regulado por um fator transcricional denominado CreA ou CreI. Esse fator possui sítios de ligação ao DNA em promotores de várias hidrolases de diversas espécies de fungos filamentosos e é responsável pelo impedimento da ligação de complexos transcricionais aos genes que codificam essas enzimas (revisto por Aro *et al.*, 2005).

A atividade ótima para a maioria das celulases fúngicas ocorre à temperatura de $50\pm 5^{\circ}\text{C}$ e em pH entre 4 e 5 (Saddler & Gregg, 1998). Entretanto, as condições reacionais ótimas são dependentes da fonte enzimática (Tengborg *et al.*, 2001).

1.4 O Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é composto por mais de 150 espécies, possuindo as mais diversas ecologias. Espécies desse gênero são ubíquas, frequentemente encontradas no solo, superfície de plantas e ar, como responsáveis pela decomposição de matéria orgânica (Pitt, 1988). Classicamente, esse gênero é descrito por suas características morfológicas como produção de esporos assexuais (conídios) nas extremidades de fiáldes suportadas por conodióforos de complexidade variável (Raper e Thom, 1949). Atualmente, abordagens como a análise do perfil de secreção de micotoxinas e a comparação de sequências gênicas têm sido utilizadas para a identificação de espécies desse grande e importante gênero (Paterson *et al.*, 2006).

Espécies de *Penicillium* são grandes produtoras de metabólitos secundários - motivo pelo qual este gênero representa um dos mais importantes no reino dos fungos em relação a benefícios à humanidade. Desde a descoberta da produção do antibiótico β -lactâmico de amplo espectro penicilina pela espécie *P. notatum* (Fleming, 1929), diversas espécies são utilizadas industrialmente para a produção de medicamentos. A espécie *P. chrysogenum* é utilizada para a produção industrial desse fármaco há mais de 50 anos (Royer *et al.*, 2004). Também pode ser citada a espécie *P. citrinum*, explorada pela produção da estatina Compactina, precursora do fármaco Pravastatina (Endo *et al.*, 1976) e a espécie *P. griseofulvum*, produtora da substância antifúngica Griseofulvina (De Carli & Larizza, 1988), indicada como potencial agente quimioterápico (Singh *et al.*, 2008).

Além de sua exploração pela indústria farmacêutica, várias espécies desse gênero são importantes para a produção de alimentos. As espécies *P. roqueforti* e *P. camemberti* são, há muito tempo, utilizadas para a produção de queijos finos e *P. nalgiovense* é empregada na fermentação de salames. Por outro lado, espécies como *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. furniculosum*, entre outras, são responsáveis pela contaminação e degradação de diversos tipos de alimentos (Pitt, 1988; Frisvad & Samson, 2004; Barkai-Golan, 2008).

Espécies de *Penicillium* também são de importância patológica. Por estarem entre os organismos mais comumente encontrados no ar, espécies de *Penicillium* são descritas como desencadeadores comuns do desenvolvimento de alergias e como fator de risco para a asma (Licorish *et al.*, 1985; Ren *et al.*, 2001). Adicionalmente, espécies utilizadas na indústria alimentícia são relatadas habitualmente como causadoras de doenças respiratórias ocupacionais (Guglielminetti *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2003).

Como responsáveis pela degradação de diversos tipos matéria orgânica, muitas espécies desse gênero executam o apodrecimento de frutas e vegetais. A colonização desses meios está associada à produção de micotoxinas – metabólitos secundários que exercem efeitos tóxicos sobre humanos e animais. Substâncias como patulina, ocratoxina A, citrinina, ácido penicílico, ácido ciclopiazônico, citreoviridina e penitrem são alguns exemplos dessas micotoxinas (revisto por Barkai-Golan, 2008).

Nos últimos anos, vários casos clínicos têm relatado a infecção sistêmica pela espécie *P. marneffei*, particularmente em pacientes imunocomprometidos pelo HIV. Descoberto em 1956, a partir do fígado do rato de bambu (*Rhizomys sinensis*), esse organismo termodimórfico apresenta melanização de sua parede celular e constitui atualmente a terceira maior causa de infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos no Sudeste Asiático. Além disso, devido a fluxos migratórios, pacientes diagnosticados com essa infecção já foram relatados em diversos países do mundo (Duong, 1996; Vossler, 2001; Youngchim *et al.*, 2005).

Espécies de *Penicillium* também se apresentam como candidatos promissores para o uso em biorremediação. Já se tem demonstrado que vários membros desse gênero possuem a capacidade de internalizar e metabolizar diversos xenobióticos, tais como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fenol e seus derivados (Leitão, 2009).

Por fim, membros desse gênero são notáveis produtores de enzimas hidrolíticas. Espécies como *P. pinophilum* (Wood, 1985), *P. funiculosum* (de Castro *et al.*, 2010), *P. decumbens* (Wei *et al.*, 2011) e *P. echinulatum* (Camassola & Dillon, 2010) são apenas alguns exemplos com grande potencial para aplicação industrial nos mais diversos processos que requerem a biodegradação de polímeros que compõem a parede celular vegetal, mais especificamente, celulose e hemiceluloses. O sistema celulolítico de espécies de *Penicillium* apresenta a vantagem da secreção de elevados níveis de β -glicosidases, em comparação com *T. reesei*. O último secreta essa enzima em pequenas quantidades, causando o acúmulo de moléculas de celobiose no ambiente reacional. Altas concentrações de celobiose são responsáveis pela inibição da atividade catalítica da enzima celobiohidrolase, de maneira mais intensa que moléculas de glicose (Ryu & Mandels, 1980; Holtzaple *et al.*, 1990).

1.5 Celulases e Xilanases do Gênero *Penicillium*

Espécies do gênero *Penicillium* são capazes de produzir diversas enzimas hidrolíticas que agem sobre componentes da parede celular vegetal. Entretanto, a produção e regulação dessas enzimas não têm sido foco de tantos estudos comparativamente com os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. Apesar disso, espécies de *Penicillium* apresentando alta produção de celulases e xilanases já foram descritas (Brown *et al.*, 1987a).

Xilanases compreendem o grupo de enzimas que possuem atividade hidrolítica sobre as ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ que compõem a cadeia principal do polímero de xilana, principal constituinte da hemicelulose na parede celular vegetal. Este heteroglicano é constituído de uma cadeia linear principal de resíduos de xilose e diversos substituintes que se encontram ligados a essa cadeia por ligações do tipo glicosídica ou éster (Figura 9) (revisto por Chávez *et al.*, 2006).

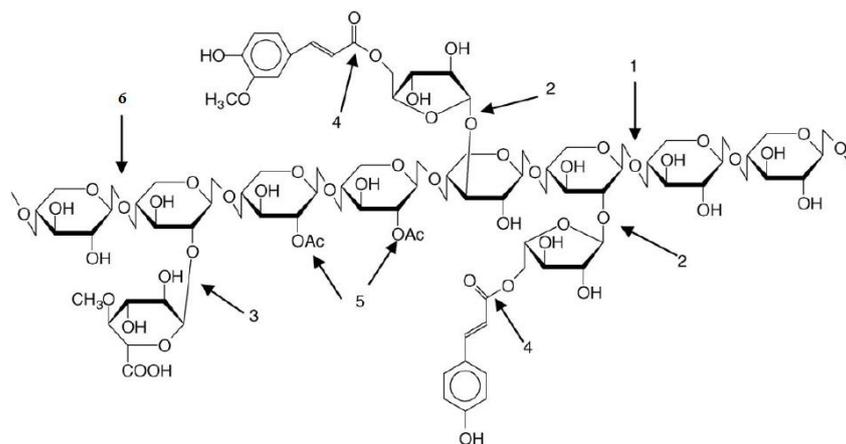


Figura 9. Estrutura da xilana. As setas correspondem aos sítios de ação das enzimas xilanases: 1 – endoxilanases; 2 – α -L-arabinofuranosidas; 3 – glicuronidas; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil-xilana esterases; 6 – β -xilosidas (Adaptado de Chávez *et al.*, 2006).

A biodegradação total da xilana requer a atuação conjunta de glicanases e esterases. As endoxilanases (E.C. 3.2.1.8) são enzimas que hidrolisam randomicamente as ligações glicosídicas que compõem cadeia principal da xilana, produzindo diversos xilooligossacarídeos. As β -xilosidas (E.C. 3.2.1.37) catalisam a hidrólise da ligação glicosídica de oligossacarídeos menores, tendo xilose como produto final. α -L-arabinofuranosidas (E.C. 3.2.1.55) removem as cadeias laterais compostas por resíduos de L-arabinofuranose. α -D-glicuronidas (E.C. 3.2.1.139) hidrolisam as ligações dos resíduos de metilglicuronato. As acetil-xilana esterases (E.C. 3.1.1.72) hidrolisam as ligações que unem os grupos acetato à cadeia principal e, finalmente, as feruloil (E.C. 3.1.1.73) e cumaril esterases (E.C. 3.1.1.-) hidrolisam esses ácidos aromáticos respectivamente, ligados a resíduos de arabinofuranosídeo (Sunna & Antranikian, 1997).

Tal como as celulasas, as xilanases possuem notáveis aplicações biotecnológicas. Desde a sua aplicação na produção de papel e do adoçante xilitol (Polizeli *et al.*, 2005), como também no enriquecimento de ração animal (Twomey *et al.*, 2003), no clareamento de sucos e cervejas (Dervilly *et al.*, 2002), na produção de têxteis (Prade, 1995) e na sacarificação do polímero de xilana para sua eventual conversão em combustíveis e produtos químicos (Saha, 2000).

Alguns exemplos de xilanases produzidas pelo gênero *Penicillium* estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de *Penicillium* analisadas quanto à produção de xilanases (adaptado de Chávez *et al.*, 2006).

Espécie	Enzimas Detectadas	Melhor Fonte de Carbono Usada para a Produção	Referência
<i>P. brasilianum</i>	Endoxilanase	Palha de Trigo oxidada a seco	Thygesen <i>et al.</i> (2003)
	β -Xilosidase	Palha de Trigo oxidada a seco	
<i>P. canescens</i>	Endoxilanase	Farinha de soja + palha de trigo	Gaspar <i>et al.</i> (1997)
	Endoxilanase	Palha de trigo + xilana	Bakri <i>et al.</i> (2003)
<i>P. capsulatum</i>	Endoxilanase	Polpa de beterraba + farelo de trigo	Filho <i>et al.</i> (1993)
<i>P. chermisinum</i>	β -Xilosidase	Xilana	Reese <i>et al.</i> (1973)
<i>P. chrysogenum</i>	Endoxilanase	Xilana (aveia)	Haas <i>et al.</i> (1992)
	Endoxilanase	Xilana	Abdel-Sater & El Said (2001)
<i>P. commune</i>	Endoxilanase	Celulose	Bradner <i>et al.</i> (1999)
<i>P. corylophilum</i>	Endoxilanase	Xilana (aveia)	Medeiros <i>et al.</i> (2003)
	Endoxilanase	Xilana	Abdel-Sater & El Said (2001)
<i>P. duclauxi</i>	Endoxilanase	Xilana	Abdel-Sater & El Said (2001)
<i>P. expansum</i>	Endoxilanase	Celulose	Bradner <i>et al.</i> (1999)
<i>P. funiculosum</i>	Endoxilanase	Celulose + farelo de trigo	Mishra <i>et al.</i> (1985)
	Endoxilanase	Xilana (aveia)	Krogh <i>et al.</i> (2004)
	β -Xilosidase	Xilana (aveia)	
	Arabinofuranosidase	Xilana (aveia)	
	Endoxilanase	Xilana	Abdel-Sater & El Said (2001)
<i>P. oxalicum</i>	Endoxilanase	Xilana	Abdel-Sater & El Said (2001)
<i>P. persicinum</i>	Endoxilanase	Xilana (aveia)	Krogh <i>et al.</i> (2004)
	β -Xilosidase	Xilana (aveia)	
	Arabinofuranosidase	Xilana (aveia)	
<i>P. purpurogenum</i>	Endoxilanase	Palha de trigo	Steiner <i>et al.</i> (1994)
	Acetil-xilana esterase	Xilana acetilada	Egaña <i>et al.</i> (1996)
<i>P. roqueforti</i>	Endoxilanase	Xilana (aveia)	Medeiros <i>et al.</i> (2003)

Os mecanismos de regulação da expressão gênica de xilanases ainda são pouco conhecidos. Diversos estudos indicam que a expressão dessas enzimas por *Penicillium* é

controlada no nível transcricional. De maneira geral, a presença de glicose é responsável pela inibição da expressão de xilanases. No nível molecular, tal inibição é causada pela presença de sítios de ligação para o fator de transcrição CreA nos promotores de xilanases. Sítios como esse já foram descritos em promotores de xilanases nas espécies *P. chrysogenum* (Zadra *et al.*, 2000), *P. canescens* (Serebryanyi *et al.*, 2002), *P. funiculosum* (Kroon *et al.*, 2000) e *P. purpurogenum* (Chávez *et al.*, 2002; Chávez *et al.*, 2004).

Por outro lado, a indução da expressão de xilanases no gênero *Penicillium* é regulada pelo fator de transcrição XlnR. Primeiramente descrito em *Aspergillus* (van Peij *et al.*, 1998), a presença de sítios de ligação para esse fator foi descrita em todos os promotores de xilanases de *Penicillium* sequenciados até 2006 (revisto por Chávez *et al.*, 2006). Geralmente, apenas um sítio de ligação para esse fator é encontrado por promotor de xilanase em *Penicillium* (Serebryanyi *et al.*, 2002; Alcocer *et al.*, 2003). Entretanto, já foram descritos genes de xilanases que possuem mais de um sítio de ligação em seus promotores, como no caso do promotor de *xylP* de *P. chrysogenum* (Zadra *et al.*, 2000). Essa multiplicidade de sítios para XlnR em promotores de xilanases é associada com níveis de expressão aumentados do transcrito. De fato, o gene *xylP* de *P. chrysogenum* é altamente expresso – assim, como uma estratégia evolutiva para o aumento da expressão gênica (Zadra *et al.*, 2000).

Espécies do gênero *Penicillium* são grandes produtoras de celulases. Em 2004, Krogh *et al.*, investigou a produção dessas enzimas em 12 espécies do gênero. Entre elas, se destaca a espécie *P. brasilianum*, com maior atividade de celulase total, demonstrada em teste de atividade sobre papel de filtro. A atividade do fungo sobre esse substrato mostrou-se superior, mesmo em comparação com a linhagem hipersecretora de *T. reesei* RUT C-30. Embora tenham apresentado menor atividade nos testes de FPase, as espécies *P. pinophilum*, *P. verruculosum* e *P. minioluteum* mostram-se promissoras para a produção de β -glicosidases.

Em um estudo comparativo da sacarificação de diferentes tipos de papel e celulose microcristalina demonstrou-se que o pool enzimático da espécie *P. funiculosum* apresentou maior rendimento de sacarificação dos substratos utilizados em comparação ao extrato enzimático de *T. reesei*. Adicionalmente, o uso conjunto das enzimas dos dois fungos apresentou resultados mais pronunciados em comparação à utilização do pool enzimático de cada organismo, indicando que o inventário enzimático de *P. funiculosum* complementa eficientemente a deficiência de β -glicosidases de *T. reesei* (van Wyk, 1999). Recentemente, de Castro *et al.* (2010) investigaram a produção de celulases nessa espécie de *Penicillium*. A

partir do emprego de fontes celulósicas sintéticas e bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes tipos de pré-tratamento, esse fungo apresentou melhor atividade de celulases totais e β -glicosidase quando a fonte de carbono do meio era composta por bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificado. O extrato enzimático bruto dessa espécie apresentou atividade ótima entre as temperaturas de 52 a 58° C e em pH 4,9. Comparado com preparações comerciais de celulases, esse fungo apresentou maior produção de açúcares redutores somente quando incubado com sabugo de milho.

Os mecanismos de regulação da expressão de celulases em *Penicillium* são escassos em comparação com as espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*. Adicionalmente, tais mecanismos não podem ser generalizados entre as diversas espécies de fungos. Um exemplo demonstrativo é o efeito do dissacarídeo sofrorose sobre a expressão dessas enzimas. Em *Trichoderma*, essa molécula age como forte indutora da expressão de celulases e xilanases. Entretanto, esse mecanismo não é observado na espécie *P. janthinellum* (Mernitz *et al.*, 1996).

Em 2008, Sun *et al.* investigaram os mecanismos de regulação da expressão basal e induzida de celulases em *P. decumbens*. A expressão basal de celulases dessa espécie é composta pela atividade de endoglicanase, β -glicosidase e celobiohidrolase. Esse estudo demonstra que a atividade das β -glicosidasas e celobiohidrolases é mantida, tanto nas condições de repressão (glicose) quanto de indução (farelo de trigo). Entretanto, a expressão de endoglicanases induzidas foi observada somente no cultivo com farelo de trigo. O estudo também mostra que endoglicanases basais e induzidas são expressas por diferentes genes.

Em 2011, Wei *et al.* realizaram a quantificação de transcritos de diversas celulases (endoglicanases) em *P. decumbens*, quando cultivada com diferentes fontes de carbono. Foi demonstrado que fontes de carbono como glicose e celobiose causam a repressão da expressão desses genes, enquanto que celulose e farelo de trigo induziram a expressão dos mesmos. Adicionalmente, baixas concentrações de lactose também foram responsáveis pela indução da expressão das celulases analisadas. Com a espécie *P. echinulatum*, Senhem *et al.* (2006) demonstraram que o cultivo do fungo em presença de celulose e lactose provocou o aumento da atividade de β -glicosidase.

1.6 *Penicillium echinulatum*

A espécie *P. echinulatum* foi primeiramente descrita como uma variedade da espécie *P. cyclopium* devido a semelhanças estruturais e morfológicas, exceto pela produção de conidióforos e conídios de aspecto áspero. Por esse motivo, essa espécie recebeu o nome de *Penicillium cyclopium* var. *echinulatum* (Raper & Thom, 1949).

Outras descrições dessa espécie como variantes foram realizadas até que, em 1977, houve o estabelecimento definitivo do táxon *Penicillium echinulatum* (Fassatiová, 1977).

Essa espécie apresenta esporos globosos, produzidos em cadeia, na extremidade de fiálides sustentadas por conidióforos simples ou ramificados (Figura 10) (revisado por Velho, 2000). Tal estrutura é muito semelhante à espécie *P. verrucosum*, embora esta não apresente conídios de coloração verde-escura (Samson *et al.*, 1976).

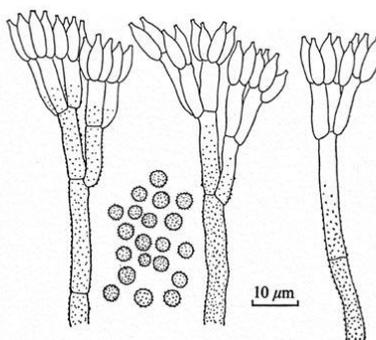


Figura 10. Representação esquemática dos conídios e conidióforos de *P. echinulatum* (Samson *et al.*, 1976).

São escassas as informações acerca desse fungo em relação a outras espécies do gênero *Penicillium*. Pertencente à classe *Eucomycota*; sub-classe *Eucomycetes*; ordem *Eurotiales*; família *Trichocomaceae*, essa espécie é facilmente identificada pela produção de metabólitos cromogênicos de cor azul e violeta, além de compostos de interesse industrial farmacêutico como: 3-metoxiviridicatina, territrem e ciclopenol (Frisvad & Filtenborg, 1983; Frisvad & Filtenborg, 1989; Svendsen & Frisvad, 1994; Frisvad & Samson, 2004).

A partir da linhagem 2HH desse fungo, diversos mutantes foram produzidos e selecionados quanto à capacidade de hidrolisar celulose, com o objetivo de obter linhagens com melhor perfil celulolítico (Figura 11). Esta linhagem foi isolada pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do Sul, Brasil, a partir do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* (Dillon *et al.*, 1992).

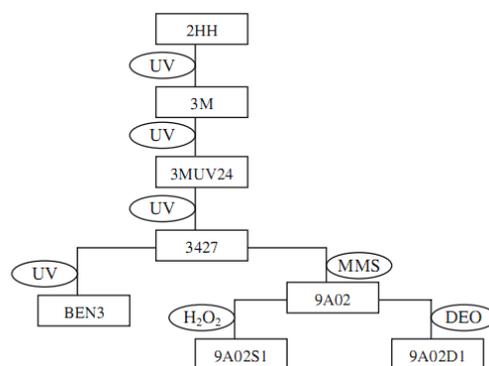


Figura 11. Filogenia das linhagens mutantes de *P. echinulatum*. As linhagens estão representadas nos retângulos e os agentes mutagênicos utilizados (UV = luz ultravioleta de comprimento de onda igual a 254nm, MMS = metilmetanosulfonato, H₂O₂ = peróxido de hidrogênio e DEO = 1,2:7,8-diepoxioctano), nas elipses (Dillon *et al.*, 2006).

Dillon *et al.* (1992) descrevem a produção de celulasas por mutantes da linhagem 3MUV24 de *P. echinulatum* em níveis similares aos produzidos por *Penicillium funiculosum* (Joglekar & Karanth, 1984) e *Penicillium pinophilum* (Brown *et al.*, 1987b).

A linhagem BEN3 mostra-se resistente ao fungicida benomil e secreta níveis superiores de celulasas em relação à linhagem parental. Adicionalmente, este microrganismo apresenta tempo de crescimento, em cultura submersa, ligeiramente menor ao relatado para a linhagem QM 9414 de *T. reesei* (Fachin *et al.*, 1995; Mandelli *et al.*, 1995).

Com o intuito de isolar linhagens ainda mais eficientes para a produção de celulasas, conídios da linhagem 9A02 foram submetidos à ação dos agentes mutagênicos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 1,2:7,8-diepoxioctano (DEO). Esses tratamentos resultaram no isolamento de dois novos mutantes: a linhagem 9A02S1 e 9A02D1, respectivamente. A linhagem 9A02S1 possui a capacidade de secretar celulasas em níveis semelhantes à linhagem hipersecretora RUT C-30 de *T. reesei* (Saddler *et al.*, 1985) quando cultivado em frascos agitados. A linhagem 9A02D1, por sua vez, apresenta melhor secreção de celulasas quando cultivada em meio semi-sólido (Dillon *et al.*, 2006).

A linhagem 9A02S1 foi avaliada quanto à produção de celulasas e xilanases quando cultivada em presença de duas distintas fontes de carbono - bagaço de cana e farelo de trigo - na condição de fermentação em estado sólido (Camassola & Dillon, 2007). Esse estudo revelou que a produção de enzimas hidrolíticas por esse organismo foi favorecida nessa condição em relação à fermentação submersa. Adicionalmente, a mistura dos substratos se mostrou vantajosa para a produção enzimática em comparação com o cultivo com somente um substrato isoladamente. Por tais fatos, o fungo *P. echinulatum* mostra-se um

microrganismo promissor para a produção simultânea de celulases e xilanases, uma vez que se mostra capaz de produzir tal perfil enzimático em meios simples, compostos por fontes baratas, tais como resíduos agrícolas (Camassola & Dillon, 2010).

Celulases da linhagem 9A02S1 apresentam grande potencial para o bioprocessamento têxtil (Rau *et al.*, 2008). Quando analisadas em experimentos de biopolimento, as enzimas desse fungo mostraram-se eficientes na redução da tendência de “pilling” (formação de fibras soltas em tecidos de algodão), além de melhor rendimento em processos de bioestonagem (produção de roupas com aspecto envelhecido através do desbotamento do tecido), em níveis próximos a uma formulação comercial de celulase total de *T. reesei*. Menor perda de peso do tecido também foi verificada utilizando o extrato enzimático de *P. echinulatum*.

Martins *et al.* (2008) compararam os sistemas enzimáticos de *P. echinulatum* e *T. reesei* (Celluclast 1.5L FG[®], Novozymes) utilizando diferentes substratos celulósicos. Foram observados que ambos os extratos enzimáticos mostraram-se semelhantes em níveis de atividade celulolítica e xilanolítica total. Individualmente, o extrato enzimático de *P. echinulatum* apresenta atividade superior de β -glicosidase em relação ao de *T. reesei*. Em contrapartida, o sistema de *T. reesei* apresenta maior atividade de celobiohidrolase.

Em 2010, Rubini *et al.* isolaram, clonaram e expressaram em *Pichia pastoris* a primeira celulase (*egl1*) de *P. echinulatum*. A estrutura predita da enzima revela a presença de três domínios funcionais distintos: um domínio de ligação a carboidratos (CBD) altamente conservado, um domínio catalítico e uma região de dobradiça intermediária. A enzima recombinante apresenta características interessantes para a indústria como atividade em uma ampla faixa de pH (5-9), temperatura ótima elevada (60°C) e retenção de atividade superior a 80% após uma hora de pré-incubação a 70°C.

1.7 A Herança Epigenética e Fungos

O termo epigenética foi empregado pela primeira vez pelo embriologista inglês Conrad H. Waddington, em 1947, para descrever os mecanismos pelos quais os genes e seus produtos produziram um determinado fenótipo. Apesar de não corresponderem ao conceito atual, os estudos de Waddington deixaram importante legado, uma vez que foram pioneiros por postular a plasticidade do genoma e a existência de variação fenotípica não diretamente ligada ao DNA (Jablonka & Lamb, 2002).

Atualmente, a epigenética é conceituada como “o estudo de alterações na função gênica que são mitótica e/ou meioticamente herdadas e que não envolvem alteração na sequência de DNA”, ou como “o estudo de componentes herdáveis não totalmente explicados ou interpretáveis pelos princípios mendelianos da hereditariedade” (Holliday, 2006).

Do ponto de vista prático, a herança epigenética pode ser considerada como alterações no padrão de expressão gênica, herdáveis ao longo de sucessivas divisões celulares, ou de sucessivas gerações de um organismo, e que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA. Os principais fenômenos epigenéticos envolvem a metilação de citosinas no DNA e modificações pós-traducionais de histonas, como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, entre outras. A metilação do DNA dificulta ou impede o acesso da maquinaria transcricional, enquanto as modificações de histonas estão relacionadas com alterações na estrutura da cromatina (relaxamento ou compactação), que levam à ativação ou à repressão da transcrição gênica (Kim *et al.*, 2009a).

A literatura científica sobre epigenética cresce exponencialmente nos últimos anos, sendo descrita a participação de eventos epigenéticos na oncogênese, doenças autoimunes, obesidade, senescência celular, problemas na reprodução assistida e na clonagem por transferência nuclear de células somáticas, plasticidade neuronal, desenvolvimento embrionário, distúrbios comportamentais como esquizofrenia e depressão, na floração de plantas e até mesmo na evolução das espécies. Nesse sentido, a epigenética é cada vez mais aceita como um mecanismo de regulação da expressão gênica universal, ainda que pouco compreendido.

Ao contrário de outros organismos, como plantas, insetos e mamíferos, estudos a respeito da regulação epigenética em fungos são ainda limitados (revisto por Brosch *et al.* 2008), sendo mais avançados em organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* (Makovets *et al.*, 2008; Mazor & Kupiec, 2009; Neves-Costa *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Riesen & Morgan, 2009;), *Schizosaccharomyces pombe* (Hansen *et al.*, 2006; Lawrence & Volpe, 2009; Anderson *et al.* 2009) e *Neurospora crassa* (Catalanotto *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2005; Rountree & Selker, 2010).

Dentre os fungos produtores de enzimas industriais, particularmente celulases e xilanases, além de *Neurospora crassa*, há alguns estudos com *Aspergillus nidulans* (Lee *et al.*, 2008; Reyes-Dominguez *et al.*, 2008), *Ascobolus immersus* (Maloisel & Rossignol, 1998;

Barra *et al.*, 2000), *Coprinus cereneus* (Freedman & Pukkila, 1993) e nos fitopatógenos *Magnaporthe oryzae* (Kadotani *et al.*, 2004; Izawa *et al.*, 2009) e *Phytophthora infestans* (Judelson & Tani, 2007; van West *et al.*, 2008). Tais estudos enfocam o silenciamento gênico mediado por alterações herdáveis na estrutura da cromatina e por RNA de interferência (RNAi), outro importante evento epigenético.

Drogas que atuam na remodelação da cromatina vêm sendo empregadas no estudo de eventos epigenéticos, sendo inclusive utilizadas no tratamento do câncer, doenças autoimunes e em estudos de regulação da expressão gênica em *A. nidulans* (Reyes-Dominguez *et al.*, 2008), *S. pombe* (Grewal *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2006), *Aspergillus niger* (Fisch *et al.*, 2009) e *S. cerevisiae* (Carmen *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 2001).

1.8 Substâncias capazes de alterar a conformação da cromatina

Atualmente, grande esforço tem sido dispendido em pesquisas que enfocam a restauração farmacológica da regulação epigenética, em situações de alterações homeostáticas (ex.: câncer). Entretanto, o uso de drogas que alteram a expressão gênica por meio de modificações epigenéticas representa uma estratégia de grande potencial para melhoramento de microrganismos de interesse industrial e maior entendimento dos mecanismos de regulação gênica.

1.8.1 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA)

A 5-aza-2'-deoxicitidina é um análogo do nucleosídeo citidina (Figura 12) e uma das primeiras drogas da classe dos inibidores de DNA (citosina-5-) metiltransferases (EC 2.1.1.37) descobertas (Jones & Taylor, 1980). Primeiramente sintetizada por Piskala e Sorm (1964), esse composto incorpora-se somente ao DNA (Li *et al.*, 1970) e, devido a sua atividade antiproliferativa de células malignas, é atualmente utilizado no tratamento de mielodisplasias (revisto por Mai & Altucci, 2009).

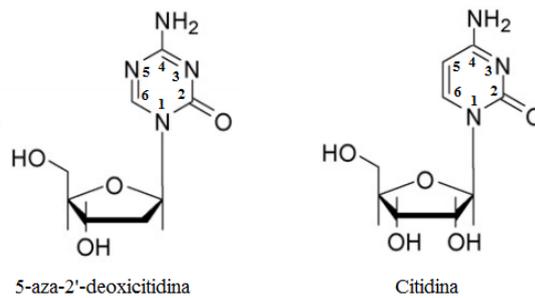


Figura 12. Estrutura química da 5-aza-2'-deoxicidina e da citidina (adaptado de Mai & Altucci, 2009).

DNA (citosina-5-) metiltransferases são enzimas que catalisam a transferência de um grupo metil para a posição cinco das citosinas em sequências de DNA específicas (Figura 13). A metilação de citosinas é um mecanismo fisiológico bem conhecido da regulação da expressão gênica. A hipermetilação das ilhas CpG leva geralmente ao silenciamento gênico e é conhecida como um marcador comum para células malignas (Esteller, 2002).

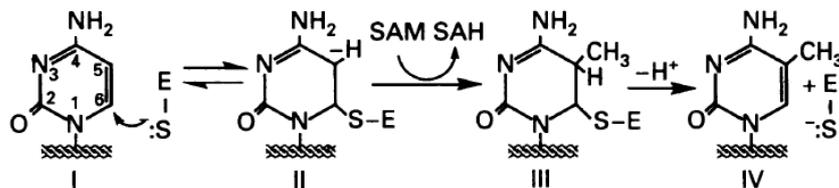


Figura 13. Mecanismo reacional da metilação de citosinas. O grupo tiol (letra S) da enzima DNA (citosina-5-) metiltransferase (letra E) realiza o ataque nucleofílico sobre a posição seis da pirimidina. Logo após, o grupo metil do composto S-adenosilmetionina (SAM) é incorporado à posição cinco da molécula (SAH = S-adenosilhomocisteína). Um complexo estável DNA-enzima é formado por uma ligação covalente. A liberação do próton na posição cinco regenera a enzima e a fita de DNA livre de enzima (Gabbara & Bhagwat, 1995).

O mecanismo de ação da droga 5-aza-2'-deoxicidina baseia-se na incorporação dessa molécula ao DNA. Por possuir um átomo de nitrogênio na posição cinco do anel pirimídico, a transferência do grupo metil não ocorre e a enzima permanece ligada covalentemente à fita de DNA (Figura 14) (Christman *et al.*, 1983). Dessa maneira, as metiltransferases não são capazes de transferir grupos metil para as citosinas das fitas de DNA hemimetiladas, geradas após o ciclo celular. Conseqüentemente, drogas como 5-AZA causam a hipometilação da molécula de DNA (Creusot *et al.*, 1982). Esse efeito é capaz de reativar a expressão de genes previamente silenciados pela hipermetilação de suas regiões regulatórias (Burgers *et al.*, 2002).

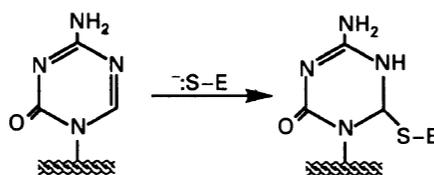


Figura 14. Mecanismo proposto por Santi *et al* (1983) para a ação da 5-aza-2'-deoxicitidina (Gabbara & Bhagwat, 1995).

Até o momento, não há relatos científicos sobre a ação dessa droga sobre a regulação da expressão de genes de hidrolases em fungos filamentosos. Entretanto, estudos com o análogo 5-azacitidina indicam que essa substância seja capaz de ativar vias metabólicas inativas e aumentar o nível de transcritos de genes induzidos em fungos (Williams *et al.*, 2008; Fisch *et al.*, 2009;).

1.8.2 Tricostatina A (TSA)

O ácido hidroxâmico Tricostatina A (Figura 15) foi originalmente isolado do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* como antifúngico (Tsuji *et al.*, 1976). Alguns anos mais tarde, a capacidade dessa droga de causar a hiperacetilação de histonas foi descoberta acidentalmente em uma análise de modificações de histonas em células tratadas com TSA, em um estudo com células leucêmicas (Yoshida *et al.*, 1990). Tal capacidade é resultado da ação inibitória dessa droga sobre as enzimas da classe das histonas desacetilases.

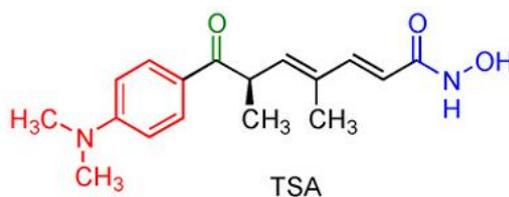


Figura 15. Estrutura química da molécula de Tricostatina A. Em vermelho está destacado o grupo 4-(N,N-dimetilamino) fenil; em verde, o grupo carbonil; em azul, o ácido hidroxâmico (Mai & Altucci, 2009).

Histonas desacetilases (HDACs) (EC 3.1.98) são enzimas que catalisam a remoção de grupos acetil dos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina agrupados na extremidade N-terminal das histonas que formam o nucleossomo. Sua atividade é dependente da presença de íons de zinco. Ademais, o uso do composto fenantrolina (agente quelante de zinco) ocasiona a perda de atividade dessa enzima (Finnin *et al.*, 1999).

As extremidades N-terminais das histonas que formam o nucleossomo são ricas em aminoácidos positivamente carregados, responsáveis pela interação com a molécula de DNA, negativamente carregada (Lenfant *et al.*, 1996). A estrutura da cromatina, formada pela interação entre DNA e histonas, quando altamente compactada, compõe uma barreira que bloqueia a interação de complexos transcricionais com promotores gênicos e, conseqüentemente, diminui ou suprime a expressão gênica.

O acesso da maquinaria transcricional ao DNA ocorre por meio de complexos proteicos de modificação que atuam alterando localmente a estrutura da cromatina para liberar regiões gênicas específicas da repressão nucleossomal (Gregory *et al.*, 2001). Modificações químicas das extremidades N-terminais das histonas, tais como a acetilação/desacetilação, caracterizam apenas um dos diversos mecanismos de modificação da estrutura da cromatina. A acetilação de histonas está diretamente ligada à transcrição de genes, enquanto que, a desacetilação de histonas está relacionada à cromatina inativa (Grunstein, 1997). Isto se deve ao fato que a acetilação das extremidades N-terminais das histonas pelas enzimas histonas acetiltransferases poder ocasionar a neutralização parcial desses sítios, proporcionando uma interação menos rígida entre essas proteínas e a molécula de DNA. Essa nova conformação da cromatina facilita o acesso de outras moléculas ao DNA, tais como fatores de transcrição, favorecendo a transcrição gênica. Por outro lado, a retirada desses grupos acetil por HDACs restabelece a carga positiva anterior e a conformação mais fechada da cromatina (Gregory *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação da droga Tricostatina A ocorre pelo bloqueio da entrada do bolsão catalítico da HDAC por interações intermoleculares entre o grupo fenil, a cadeia alifática da molécula de TSA e aminoácidos hidrofóbicos localizados nessa porção do bolsão tubular da enzima. O grupo ácido da molécula de TSA quela o íon de zinco, localizado no fundo do bolsão, formando um complexo que inativa a enzima (Figura 16) (Finnin *et al.*, 1999).

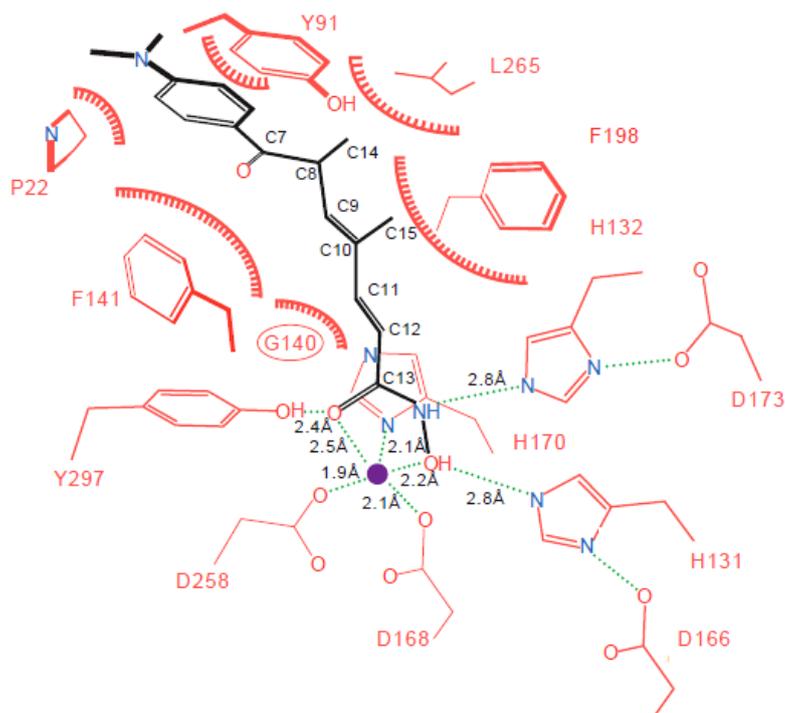


Figura 16. Representação esquemática das interações entre a enzima histona desacetilase-like de *Aquifex aeolicus* e a molécula de TSA. O íon de zinco está representado como o círculo preenchido de cor roxa. Os semicírculos vermelhos representam as interações de van der Waals entre a cadeia alifática da molécula de TSA e a porção hidrofóbica do bolsão catalítico da enzima. As linhas pontilhadas de cor verde representam as ligações de hidrogênio (adaptado de Finnin *et al.*, 1999).

Essa droga apresenta uma grande variedade de mecanismos potenciais para a terapia do câncer. Entretanto, devido à sua toxicidade, a Tricostatina A é indicada, até o momento, como possível agente adjuvante no tratamento de leucemias. Essa substância apresenta efeito sinérgico para o aumento do efeito de diversos agentes quimioterápicos convencionais (Glaser, 2007).

Há relatos sobre a ação de ácidos hidroxâmicos na alteração da expressão gênica em fungos (Henrikson *et al.*, 2009; Fisch *et al.*, 2009); . Entretanto, são poucos os estudos que investigam a influência direta da Tricostatina A. Como exemplo, Shwab *et al.* (2007) relatam o possível uso de tricostatina A para o aumento da expressão de metabólitos secundários em fungos, como demonstrado nas espécies *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*.

1.8.3 Butirato de Sódio (NaBut)

Butirato de sódio (Figura 17) é um ácido graxo de cadeia curta produzido naturalmente no intestino pela fermentação microbiana de fibras ingeridas (Cummings *et al.*, 1987). Essa molécula age como regulador de vias de maturação de células epiteliais do cólon, tais como: parada do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose (Mariadason *et al.*, 2000).

O butirato de sódio é um inibidor não competitivo da atividade de HDACs. Relatos apontam que essa droga também seja capaz de afetar os mecanismos de fosforilação e metilação de histonas e do DNA (revisto por Mai & Altucci, 2009).

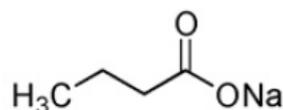


Figura 17. Estrutura química da molécula de butirato de sódio (Mai & Altucci, 2009).

Devido a seu efeito antiproliferativo e baixa toxicidade, essa droga tem chamado a atenção para seu potencial uso quimioterápico. Adicionalmente, os butiratos têm sido relatados na literatura científica por sua atividade inibitória do crescimento de carcinomas cervicais, endometriais, prostáticos e de cólon, em estudos clínicos. (Terao *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2001; Carducci *et al.*, 2001).

A ação dessa substância leva à hiperacetilação de componentes da cromatina e alteração da expressão gênica (Candido *et al.*, 1978; Kim *et al.*, 2009b). Até o momento, não há relatos do uso dessa droga para avaliar alterações na expressão gênica em fungos filamentosos de interesse industrial.

1.9 Análise de fungos produtores de celulasas e xilanases por microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica constitui uma ferramenta científica poderosa e apresenta inúmeras aplicações em várias áreas do conhecimento. Em biotecnologia, essa técnica é utilizada para a investigação do crescimento microbiano, caracterizar a ultraestrutura de microrganismos, analisar a ação de enzimas sobre substratos, entre outros.

Dentre as aplicações práticas das xilanases, a sua utilização na indústria de polpa e papel merece destaque. Atualmente, o tratamento enzimático da polpa Kraft, antes do processo de branqueamento, constitui uma das mais importantes aplicações industriais para as

xilanases (Bae *et al.*, 2008). A utilização dessas enzimas tem por objetivo a retirada de lignina, que age como barreira para a penetração de compostos químicos, durante a etapa de branqueamento (Ragauskas *et al.*, 1994). Em segundo lugar, o uso de xilanases visa à produção com qualidade superior (maior brilho), baixo custo e menor necessidade de uso de tratamentos químicos poluentes (Beg *et al.*, 2000; Bae *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstram a capacidade da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar o desempenho de xilanases e celulases sobre diversos tipos de polpa vegetal. Como exemplo, Beg *et al.* (2000) avaliaram o efeito do tratamento da polpa kraft de eucalipto com a xilanase de uma espécie de *Streptomyces*. O tratamento com essa enzima gerou maior porosidade, entumescimento e separação das fibras e fibrilas, quando comparado à superfície lisa da polpa não submetida ao tratamento (Figura 18). As modificações estruturais apresentadas na fibra aumentaram sua acessibilidade e, conseqüentemente, redução da concentração de compostos químicos utilizados no processo de branqueamento da polpa.

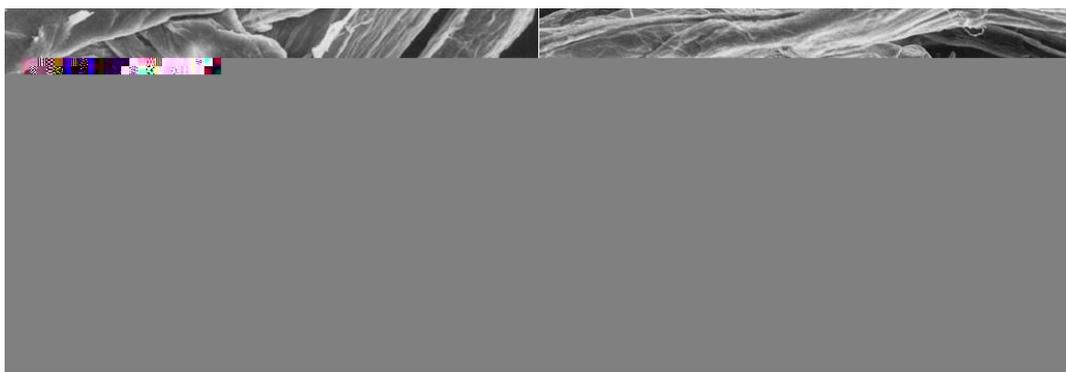


Figura 18. Eletromicrografias de varredura de uma amostra de polpa kraft de eucalipto não submetida a tratamento algum (imagem à esquerda) ou quando tratado com xilanase de *Streptomyces* sp. (à direita) (Beg *et al.*, 2000).

Nesse mesmo estudo, foi avaliado o modo de crescimento de *Streptomyces* sp. sobre a polpa de eucalipto (Figura 19). Por meio do uso da técnica de MEV, foi possível observar o desenvolvimento micelial entremeado no substrato. Adicionalmente, foi verificada a presença de orifícios na estrutura da polpa, demonstrando a penetração desse actinomiceto no substrato.

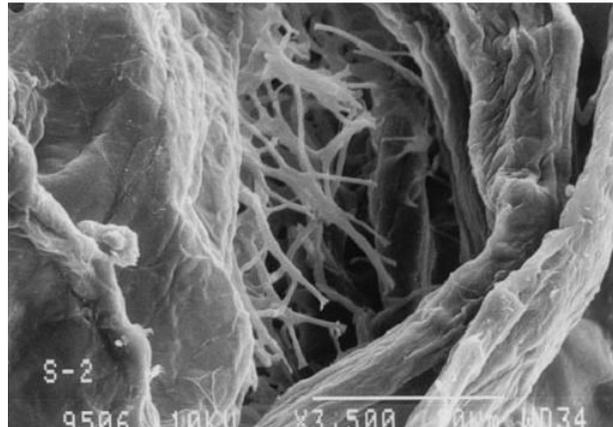


Figura 19. Eletromicrografia de varredura demonstrando o crescimento do micélio de *Streptomyces* sp. sobre uma amostra de polpa Kraft de eucalipto (Beg *et al.*, 2000).

Em 2009, Kumar *et al.* avaliaram os efeitos de uma xilanase da espécie *Thermomyces lanuginosus* sobre a polpa de bagaço de cana-de-açúcar. Semelhantemente ao estudo anterior, a amostra de polpa tratada enzimaticamente apresentou maior heterogeneidade e fibras protuberantes em sua superfície, indicando que a ação dessa enzima não se restringiu apenas a eliminação de xilana, mas também na alteração da estrutura das fibras (Figura 20).

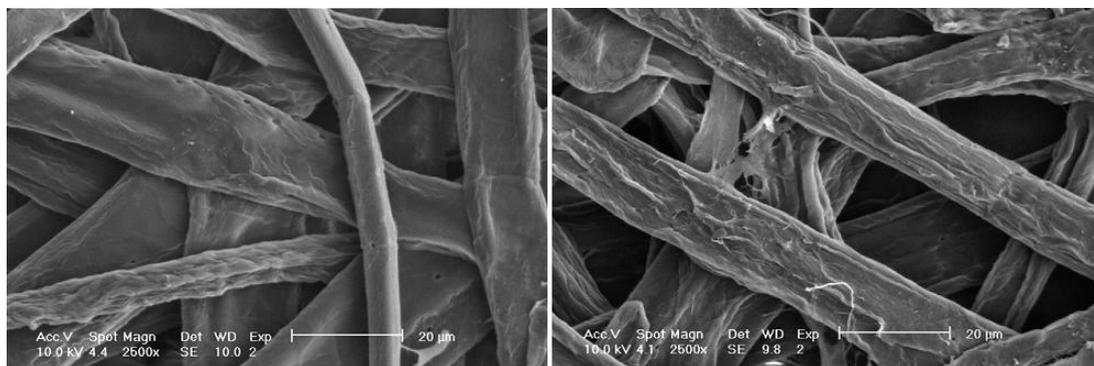


Figura 20. Eletromicrografias de varredura de amostras de polpa de bagaço. À esquerda, está representada a amostra controle. À direita, a amostra tratada com xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (Kumar *et al.*, 2009).

Numerosos estudos apresentam a aplicação de técnicas microscópicas de alta resolução para avaliar o efeito de celulasas sobre produtos e substratos têxteis.

O uso de celulasas em bioestonagem substitui em grande parte os métodos antigos de abrasão física. A eliminação de pequenas fibras protuberantes sobre a superfície de tecidos (biopolimento) e a remoção de impurezas das fibras de algodão representam também aplicações importantes dessas enzimas na indústria de vestuários. A substituição de processos

industriais convencionais por processos enzimáticos propicia menor desgaste dos tecidos, melhor aspecto do produto final e menor utilização de compostos químicos poluentes (Csiszár *et al.*, 2001).

Como exemplo de uso da microscopia eletrônica para a investigação de celulases em substratos têxteis, pode-se citar o estudo de Vasconcelos & Cavaco-Paulo (2006). Avaliou-se a capacidade de remoção de componentes celulósicos para a produção de um tecido de baixo peso (misto de poliéster e algodão), por uma formulação comercial de celulases de *T. reesei* (Figura 21). O extrato enzimático utilizado mostrou-se eficiente na remoção da celulose em nível semelhante a tratamentos químicos convencionais.

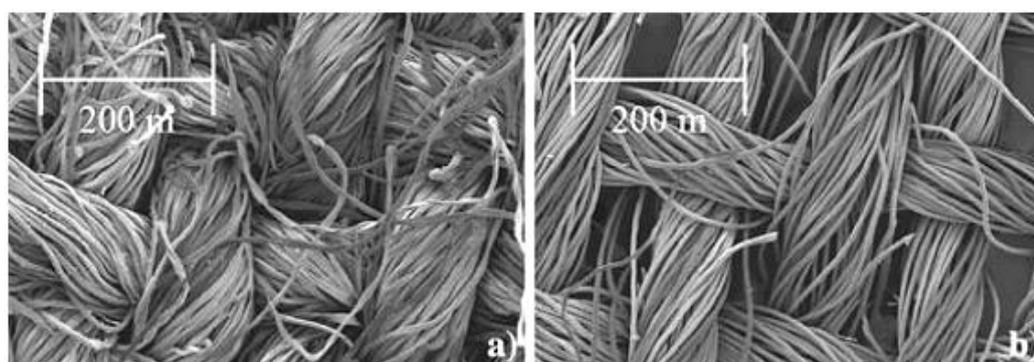


Figura 21. Eletromicrografia de varredura (100x) de um tecido misto composto por poliéster/algodão tratado, ou não, com celulases para a remoção de fibras de algodão. (a) Fibras sem tratamento, (b) Fibras tratadas com Cellusoft L.(Vasconcelos & Cavaco-Paulo, 2006).

Boisset *et al.* (1997) investigaram a interação entre fibras de algodão e a endoglicanase V de *Humicola insolens* usando as técnicas de MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A enzima mostrou-se capaz de reduzir o nível de “pilling” (fibras soltas) em fibras de algodão submetidas a várias lavagens (Figura 22).

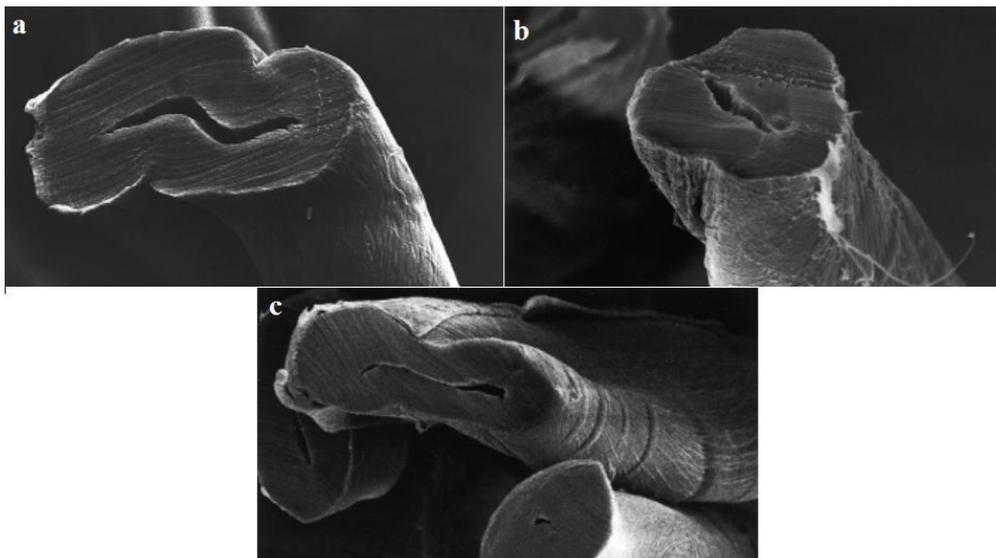


Figura 22. Eletromicrografias de varredura de cortes transversais de fibra de algodão. (a) fibra de algodão original, (b) fibra de algodão lavada 25 vezes e (c) fibra de algodão lavada 25 vezes e submetida a uma lavagem com endoglicanase V de *Humicola insolens* (adaptado de Boisset *et al.*, 1997).

Esse último estudo também apresenta a distribuição da endoglicanase V sobre as fibras de algodão por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 23). Para possibilitar essa análise, as enzimas foram ligadas a anticorpos marcados com partículas de ouro. Foi observada a presença de enzimas somente na superfície da fibra de algodão, sugerindo que os sítios de ligação para essa enzima estão localizados preferencialmente na superfície externa da fibra.

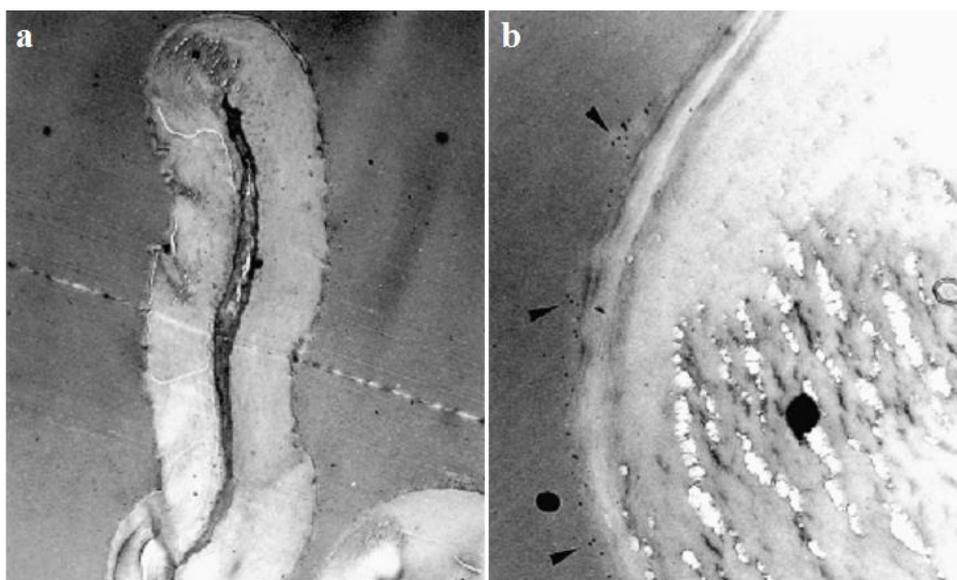


Figura 23. Eletromicrografia de transmissão de uma fibra de algodão tratada com endoglicanase V. (a) Corte transversal da fibra de algodão. (b) Detalhe da secção revelando as partículas de ouro agrupadas em torno da fibra (indicadas pelas setas negras) (adaptado de Boisset *et al.*, 1997).

II – OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o crescimento do fungo *Penicillium echinulatum* e a expressão de genes do complexo celulolítico em diferentes fontes de carbono e na presença de drogas moduladoras de estados epigenéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características morfológicas e ultraestruturais de *P. echinulatum* cultivado em condições de indução e repressão do sistema celulolítico por MET;
- Comparar o modo de crescimento do fungo e a atividade enzimática sobre diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar por MEV;
- Comparar o nível de expressão de genes do sistema celulolítico de *P. echinulatum* cultivado em condições indutoras e repressoras;
- Comparar o efeito de diferentes drogas modificadoras da estrutura da cromatina sobre a expressão de genes do sistema celulolítico de *P. echinulatum* por meio da quantificação relativa do nível de transcritos, assim como avaliar a atividade enzimática (celulases e xilanases) presente no sobrenadante dos meios de cultura.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de *Penicillium echinulatum* 9A02S1 (depositada no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942) pertencente a coleção de microrganismos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do Sul. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon (UCS).

3.2 Soluções e meios utilizados para o cultivo de *P. echinulatum*

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas para cultivo de *P. echinulatum* foram preparados com água destilada e o seu pH ajustado com ácido clorídrico 1M ou hidróxido de sódio 1M. Após a preparação, os meios de cultura e solução foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos a 1atm, a menos que especificado outro método. Além disso, foi adicionado o antibiótico ampicilina (100µg/mL) a todos os meios de cultura previamente ao inóculo de micélio ou conídios de *P. echinulatum*.

3.2.1 Meio ágar-dextrose-batata (BDA) para produção de conídios de *P. echinulatum*

BDA	37 g
H ₂ O	q.s.p. 1000 mL

3.2.2 Solução de elementos traço

Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O	40mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	400mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	714mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	800mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8mg
Ajustar pH para 2	
H ₂ O q.s.p.	1000mL

3.2.3 Solução de sais

KCl	26g
MgSO ₄ 7H ₂ O	10g

KH ₂ PO ₄	76g
Solução de elementos traço	50mL
H ₂ O q.s.p.	1000mL

3.2.4 Meio mínimo para cultivo na presença de drogas remodeladoras da cromatina

Solução de sais	20mL
Ajustar pH para 6,8	
H ₂ O q.s.p.	1000mL
Fontes de carbono utilizadas nesse meio:	
Glicose	1% ou 2% (p/v) ou
Bagaço de cana explodido a vapor	0,1% (p/v)

3.2.5 Celulose intumescida (2,5%)

Celufloc 200 [®]	5g
H ₂ O	60mL
Pérolas de vidro	20

Autoclavar por 30min e incubar em shaker rotatório (180rpm/48h). Logo após, adicionar 140mL de água destilada estéril e homogeneizar.

3.2.6 Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (repressão enzimática)

Extrato de levedura	5g
Peptona	2g
Solução de sais	20mL
Glicose	3% (p/v)
H ₂ O q.s.p.	1000mL

3.2.7 Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (indução enzimática)

Peptona	1g
Tween 80	1mL
Solução de sais	20mL
Celulose intumescida (2,5%)	400mL (1% final)
H ₂ O q.s.p.	1000mL

3.2.8 Meio de cultivo para crescimento e posterior análise por microscopia eletrônica de varredura

Peptona	1g
Tween 80	1mL
Solução de sais	20mL
Bagaço de cana (<i>in natura</i> ou explodido a vapor)	1g (0,1% final)
H ₂ O q.s.p.	1000mL

3.2.9 Solução de ampicilina 50mg/mL (estoque)

Ampicilina (Sigma-Aldrich [®])	5g
H ₂ O Milli Q	100mL

Após a dissolução total, a solução foi filtrada (membrana 0,22 μ m), em condições estéreis, armazenada à temperatura de -20°C e protegida da luz até o uso.

3.2.10 Tampões e soluções para corrida de gel de agarose

- **Tampão Tris-Borato EDTA (TEB 10X)**

Tris base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA (0,5M, pH 8)	20mL
Ajustar pH para 8,4	
H ₂ O q.s.p.	1000mL

- **Tampão de amostra (5X)**

TEB 10X	25% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno cianol	0,25% (p/v)

- **Brometo de etídeo (10mg/mL)**

Brometo de etídeo	10g
H ₂ O Milli Q	1000mL
Armazenar protegido da luz	

- **Gel de agarose (1%)**

Agarose	1g
TEB 0,5X	100mL

3.2.11 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

- **Tampão de amostra para proteína (2x)**

Tris-HCl 1 M, pH 6,8	200mM
SDS	4,0% (p/v)
β -Mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	20,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

- **Acrilamida:Bis-Acrilamida 30% (29:1)**

Acrilamida	29g
Bis-acrilamida	1g
Água destilada	q.s.p. 100mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada em frasco escuro a 4°C.

- **Solução corante**

Azul Brillhante de Comassie R-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)
Diluir em H ₂ O e filtrar	

- **Solução descorante**

Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

- **Tris-HCl 1,5M pH 8,8**

Tris base	18,2g
Água destilada	q.s.p. 100mL
Ajustar o pH para 8,8	

- **Tris-HCl 1M pH 6,8**

Tris base	12,1g
Água destilada	q.s.p. 100mL
Ajustar o pH para 6,8	

- **Persulfato de Amônio (APS) 25% (p/v)**

Persulfato de Amônio (P.A.)	2,5g
Água destilada	q.s.p. 10mL

- **Tampão de Corrida – Tris-Glicina 5x (Estoque)**

Tris base	16,7g
Glicina	104,5g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1%.

3.2.12 Soluções e tampões para ensaios de atividade enzimática (DNS)

- **Tampão acetato de sódio 0,5M, pH 5 (estoque)**

Acetato de sódio	8,2g
Ajustar pH para 5 com ácido acético glacial	
H ₂ O	q.s.p. 200mL

- **Reagente DNS (Miller, 1959)**

Ácido dinitrosalicílico (DNS)	10g
NaOH 2M	200mL
Tartarato de sódio e potássio	300g
H ₂ O	q.s.p. 1000mL

O tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em 500ml de água destilada aquecida e adicionado ao DNS previamente dissolvido em NaOH, também aquecido. A solução foi agitada, sobre constante aquecimento, até ser observada a completa dissolução dos reagentes. O volume foi então completado para 1000 mL com água destilada.

- **Carboximetilcelulose 3%**

Carboximetilcelulose (CMC <i>low viscosity</i> – Sigma-Aldrich)	0,3g
---	------

H₂O

10mL

- **Xilana oat spelt 1% (p/v)**

Xilana oat spelt (Sigma-Aldrich™)	1g
NaOH 1M	20mL
HCl 1M	20mL
Tampão acetato de sódio 100mM (pH 5)	q.s.p. 100mL

Agitar por 1h, centrifugar por 20min e recolher o sobrenadante.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Cultivo do fungo: 10⁵ esporos/mL de *P. echinulatum* foram inoculados em 100mL de meio de cultivo para microscopia eletrônica de varredura. O fungo foi cultivado em shaker rotatório (90rpm/28°C) pelo período de cinco ou oito dias. Para a análise morfológica das hifas do fungo, a mesma quantidade de esporos foi inoculada em 100mL de meio descrito no item 3.2.6, e cultivados por 24h em shaker rotatório (180rpm/28°C).

Processamento das amostras: para a visualização das amostras em microscópio eletrônico de varredura, fragmentos de micélio e bagaço de cana-de-açúcar foram coletados e cuidadosamente acondicionados em tubos do tipo eppendorf. Para a visualização de esporos de *P. echinulatum*, fragmentos de meio BDA em placa de petri, contendo esporos, foram cortados com navalha e cuidadosamente acondicionados em tubos do tipo eppendorf.

As amostras foram fixadas em com solução de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,3) durante três horas à temperatura ambiente e durante a noite (aprox. 12 horas) à 4°C. As amostras foram então lavadas três vezes (15min cada) com tampão cacodilato de sódio 0,05M e pós-fixadas com tetróxido de ósmio (2%), por 1,5h. O processo de pós-fixação foi todo realizado tendo as amostras protegidas da luz. Após esse período, as amostras, ainda protegidas da luz, foram enxaguadas três vezes com água destilada. Logo após, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70% e 90% - 30min cada; 100% - três incubações de 15min cada). Imediatamente após, as amostras foram submetidas ao procedimento de secagem ao ponto crítico com CO₂ (BAL-TEC CPD 030), acondicionadas em “stubs” de chumbo e metalizadas com ouro através de processo de “sputtering” (Balzers

Union SCD-040 Sputter). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7500F), operado a 15kV.

3.4 Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a expressão de celulases de *P. echinulatum* (essa etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul)

Cultivo do fungo: esporos de *P. echinulatum* (10^5 esporos/mL) foram inoculados em 100mL de meio composto por diferentes fontes de carbono (glicose 1% ou celulose intumescida 1%). O cultivo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, em shaker rotatório (180rpm/28°C) por 144h, sendo coletadas amostras miceliais a cada 24h. Após a coleta, as amostras foram congeladas a -80°C, até o procedimento de extração de RNA.

Extração de RNA total: para a extração de RNA total, as amostras foram maceradas em presença de $N_2(L)$ e adicionado 2mL do reagente TRI Reagent (Sigma-Aldrich®), por amostra. Foi seguido o protocolo do fabricante. As amostras de RNA total foram quantificadas e avaliadas quanto a sua integridade no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídeo. Com o objetivo de eliminar qualquer resíduo de DNA contaminante das amostras, cerca de 15µg, foram submetidas ao tratamento com a enzima DNase (RQ1 RNase-free DNase – Promega®) de acordo com o protocolo do fabricante. Após esse tratamento, as amostras foram precipitadas durante a noite com acetato de sódio 3M (0,1V), 2,5V de etanol absoluto e glicogênio (50µg/mL), à -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (14000rpm/30min/4°C), os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os *pellets* foram lavados com etanol 70% gelado. Após duas lavagens, as amostras foram secas à temperatura ambiente, ressuspensas em H₂O Milli Q e novamente quantificadas e avaliadas quanto a sua integridade no equipamento Nanodrop e por eletroforese em gel de agarose (1%). As amostras seguiram então para a reação de RT-PCR.

Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR): a reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com 1µg de RNA total de cada amostra. Esse procedimento foi realizado utilizando o kit da enzima Super Script III Reverse Transcriptase® (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante. O iniciador utilizado foi o Oligo d(T)₁₂₋₁₈ (Invitrogen®).

PCR em tempo real: para as análises de expressão gênica foram realizados experimentos de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados no aparelho 7500 *Fast Real-Time System* (Applied Biosystems™) em reações de 10µL contendo 0,2µM de cada oligonucleotídeo (*foward/reverse*), 5µL de solução completa para PCR *Fast SYBR Green Master Mix (2X)* (Applied Biosystems™), 1µl da reação diluída (1:10) de síntese de cDNA como molde e H₂O Milli Q para completar o volume de 10µL. Após a desnaturação inicial à 95°C por 20s, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos à 95°C por 3s e 60°C por 20s. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. A quantificação relativa do nível dos transcritos (*fold-change*) de cada gene foi calculada pelo software 7500 (versão 2.03) a partir do método de 2^{-CT} (Livak & Schmittgen, 2001), sendo utilizado o gene constitutivo de actina de *P. echinulatum* para normalização.

Os experimentos foram realizados em triplicata para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados a partir de sequências gênicas parciais obtidas em uma biblioteca de expressão de *P. echinulatum* sob condições de indução do sistema celulolítico (Rubini, 2009), usando o software *Primer 3*, disponível no endereço eletrônico <http://frodo.wi.mit.edu/> e o software *Primer Express* (versão 3.0). Os primers usados foram sintetizados pela companhia *Integrated DNA Technologies* (IDT) e estão listados na Tabela 3.

Tabela 2. Lista de iniciadores sintéticos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	Primer	Sequências de Nucleotídeos
Endoglicanase	qRT-PCR Egl Foward	5' CGG TTG ATC CCC AAC TCA AT -3'
	qRT-PCR Egl Reverso	5' ACC GAG CGA GGT GAT GAA GT -3'
Celobiohidrolase	qRT-PCR Cbh Foward	5'- CCT TTG GCG ACA CTG ATG ATT T -3'
	qRT-PCR Cbh Reverso	5'- TCA TCC CAG AGA CTC ATG ACC A -3'
β-glicosidase	qRT-PCR Bgl Foward	5' - GGC TCC GTC ATG TGT TCG TA -3'
	qRT-PCR Bgl Reverso	5' - TCC CTT GAG CAG CTT GTT GA - 3'
Swolenina	qRT-PCR Bgl Foward	5'- ACG GCC AAC AGA TTG TGA ATG -3'
	qRT-PCR Bgl Reverso	5'- GTG AAC TGC ACT CCC ATG TCA A -3'
Actina	qRT-PCR Actin Foward	5' -AAC TCC TCC TCG AAA CCC TCC A - 3'
	qRT-PCR Actin Reverso	5' - GTC GTG TAC TGT GAG GTG CAT ACT T - 3'

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Cultivo do fungo: 10^5 esporos/mL de *P. echinulatum* foram inoculados em 100mL de meio de cultivo para microscopia eletrônica de transmissão, em condições de repressão ou indução enzimática. O fungo foi cultivado em shaker rotatório (180rpm/28°C) pelo período de um, três ou seis dias.

Processamento das amostras: para a visualização de detalhes ultraestruturais das amostras coletadas, fragmentos de micélio foram filtrados, lavados com água destilada e fatiados com navalha em pedaços menores (cerca de 1mm^3) em presença de solução fixadora. Os fragmentos de micélio foram fixados em tubos do tipo eppendorf com solução fixadora de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,3) durante três horas à temperatura ambiente e durante a noite (aprox. 12 horas) à 4°C. As amostras foram então lavadas três vezes (15min cada) com tampão cacodilato de sódio 0,05M e pós-fixadas em uma mistura (1:1 v/v) de tetróxido de ósmio (1%) e ferrocianeto de potássio (0,8%), por 1,5h. O processo de pós-fixação foi todo realizado tendo as amostras protegidas da luz. Após esse período, as amostras, ainda protegidas da luz, foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato de sódio 0,05M (15min cada) e enxaguadas três vezes com água destilada. Logo após, as amostras foram submetidas à contrastação “in block”: incubação durante a noite, à temperatura de 4°C, em solução de acetato de uranila (0,5%). No dia seguinte, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada e desidratadas com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70% e 90% - 30min cada; 100% - três incubações de 15min cada).

Após a etapa de desidratação, as amostras foram infiltradas com misturas crescentes de resina Spurr[®] e decrescentes de acetona, iniciando na proporção (acetona:resina) 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3 e resina pura. Cada etapa de infiltração durou de doze a vinte horas, com exceção da última (resina pura), realizada durante seis horas e com a tampa do tubo eppendorf aberta para facilitar a evaporação da acetona remanescente. Em seguida, as amostras foram incluídas, em fôrmas de silicone, com a resina Spurr[®] e incubadas a 60°C por 65h para a polimerização da resina.

O material foi seccionado em ultramicrótomo Reichert Supernova, utilizando-se navalhas de vidro para a obtenção de cortes semi-finos (2 a 5mm de espessura) e navalha de diamante para cortes ultrafinos (70nm de espessura). Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 300 mesh.

O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol 1011[®] e operado à 80kV. A captura de imagens foi realizada com o software Gatan Digital Micrograph[™], versão 3.11.0 (Copyright[©] 1997-2006).

3.6 Drogas modificadoras da estrutura da cromatina

Nesse estudo foram utilizadas as seguintes drogas com ação sobre a estrutura da cromatina: 5-aza-2'-deoxicitidina (Sigma-Aldrich[®]), Tricostatina A (Cayman Chemical[®]) e Butirato de sódio (Cayman Chemical[®]). Butirato de sódio foi diluído em H₂O Milli Q estéril e armazenado a temperatura ambiente (o resfriamento causou precipitação do composto). 5-aza-2'-deoxicitidina também foi diluída no mesmo veículo e armazenada a -20°C. A Tricostatina A foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -20°C.

3.7 Teste de crescimento de *P. echinulatum* com drogas modificadoras da estrutura da cromatina

Para esse experimento, 500 esporos de *P. echinulatum* foram inoculados no centro de placas de petri pequenas (48mm de diâmetro), contendo 10 mL de meio BDA com a presença, ou ausência das drogas modificadoras da estrutura da cromatina (TSA, 5-AZA ou NaBut). O diâmetro dos halos de crescimento do fungo foi medido pelo período de 48 à 144h, ou até o preenchimento total da superfície do meio pelo fungo. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada grupo experimental.

3.8 Análise do efeito de drogas modificadoras da estrutura da cromatina sobre a expressão de celulasas de *P. echinulatum*

Cultivo do fungo: 10⁸ esporos/mL de *P. echinulatum* foram incubados em 40mL de meio mínimo, contendo como única fonte de carbono, bagaço de cana explodido a vapor (0,1%) ou glicose (1% nas primeiras 72h 2% para as últimas 48h). A incubação foi realizada em shaker rotatório (180rpm/28°C) durante cinco dias. Nos três primeiros dias, o fungo foi cultivado sem qualquer alteração de seu meio. Nos últimos dois dias de cultivo, foram adicionadas as drogas Tricostatina A (0,25µM ou 25nM), 5-aza-2'-deoxicitidina (25µM ou 2,5µM) ou Butirato de sódio (1mM ou 10µM). Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Ao fim do período de cultivo, os micélios foram filtrados, foi mensurado o seu peso úmido e logo após foram congelados com N_{2(L)} e armazenados a -80°C. Os sobrenadantes de

cultura foram coletados, conservados com a adição de azida sódica (0,02%) e armazenados à 4°C até sua utilização nos ensaios enzimáticos (seção 3.9). O RNA total das amostras miceliais congeladas foi extraído como descrito na seção 3.4. O experimento de qRT-PCR com essas amostras foi realizado como descrito também na seção 3.4.

3.9 Ensaios enzimáticos

A atividade hidrolítica dos sobrenadantes dos cultivos de *P. echinulatum* foi determinada por ensaio colorimétrico de detecção de açúcares redutores gerados pela hidrólise dos substratos papel de filtro (Whatman nº 1), carboximetilcelulose (CMC *low viscosity* – Sigma-AldrichTM) e xilana (oat spelts - Sigma-AldrichTM). Para a detecção de açúcares redutores em solução foi utilizado o reagente DNS (Miller, 1959), seguindo o protocolo de Ghose (1987), com alterações, para os ensaios de atividade de celulase total e atividade de endoglicanases. Para os ensaios de xilanase total, foi utilizado o protocolo descrito por Filho *et al.*, (1993), com alterações.

O ensaio enzimático de atividade de celulase total (FPase), ou atividade de papel de filtro utilizou como substrato uma pequena tira sanfonada de papel de filtro de 1 x 0,6cm (aprox. 5mg) para cada reação. O ensaio de CMC, por sua vez, teve como substrato 50µL de solução aquosa de CMC 3% (p/v) para cada reação e, por fim, o ensaio de xilanase total usou 50µL de xilana *oat spelt* 1% para cada reação. Em todos os ensaios, foram adicionados 50µL de sobrenadante de cultura por reação. Todos os sistemas reacionais foram tamponados com tampão acetato 0,05M, pH 5, para o volume final de 150µL.

As reações foram incubadas em banho-maria a 50°C por 60min, para os ensaios de FPase e xilanase total, ou 30min, para o ensaio de CMCase. Após esse período, adicionou-se 300µL de reagente DNS em cada reação. As amostras foram então fervidas por 5 minutos e diluídas com 1,5mL de água. Logo após, foi mensurada a absorbância ao comprimento de onda de 540nm, em espectrofotômetro SpectraMax Plus³⁸⁴ Microplate Reader (Molecular DevicesTM). As leituras de absorbância foram convertidas em quantidade de equivalente de glicose, para os ensaios de CMCcase e FPase, ou em quantidade equivalente de xilose (xilanase total), por meio da curva de calibração obtida pela leitura da absorbância de diferentes concentrações (20 a 200µg) desses monossacarídeos com o reagente DNS (Figuras 24 e 25). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O branco de leitura do espectrofotômetro foi composto de 150µL de solução tamponada com tampão acetato 0,05M,

pH 5. Como controle da concentração inicial de açúcares redutores no meio de cultivo, somente o sobrenadante de cultura tamponado foi submetido a todas as etapas do experimento e sua absorbância (540nm) foi subtraída do respectivo grupo reacional. Uma unidade internacional de ação enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para gerar $1\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de produto de hidrólise (Ghose, 1987).

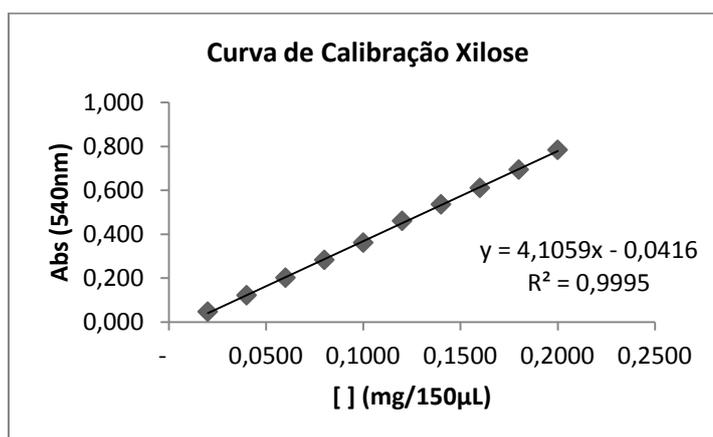


Figura 24. Curva padrão de xilose utilizada para medir a quantidade de açúcares redutores no ensaio enzimático de xilanase total.

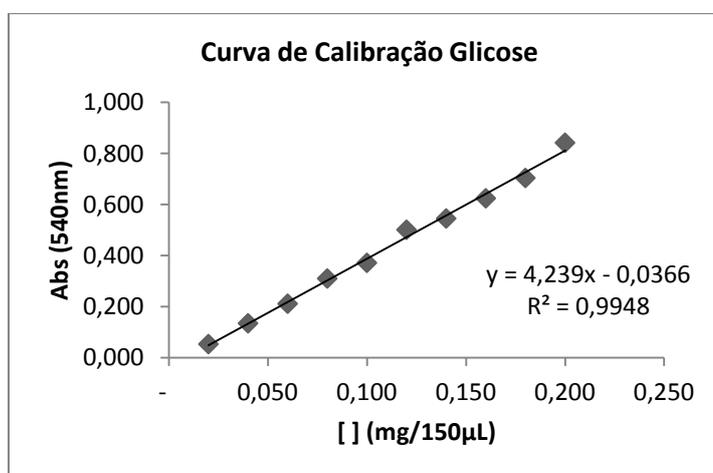


Figura 25. Curva padrão de glicose utilizada para medir a quantidade de açúcares redutores nos ensaios enzimáticos de FPase e CMCase.

3.10 Precipitação de proteínas de *P. echinulatum*

Quatro mililitros de cada sobrenadante de cultura foram precipitados pela adição de 1mL de ácido tricloroacético 100%. Depois de incubadas por 2h, à -20°C , as amostras foram centrifugadas a 8000rpm/30min/ 4°C . Logo após, os sobrenadantes foram descartados e o

pellets foram lavados com 1mL de acetona 100% gelada e novamente centrifugados nos mesmo parâmetros. Os precipitados foram secos à temperatura ambiente e ressuspensos com tampão de amostra para proteína 2X para o volume final de 20 μ L. As amostras foram estocadas a -20°C até a análise em gel de SDS-PAGE.

3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS-PAGE

As amostras do item anterior foram submetidas à análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante. A preparação do gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Tabela 3. Reagentes utilizados para a preparação de gel de SDS-PAGE

Reagentes	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 5%
H2O destilada	3,96 mL	3,4mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1)	4,8 mL	0,83mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3mL	
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8		0,63mL
SDS 10%	120 μ L	50 μ L
TEMED	4,8 μ L	5 μ L
APS 25%	48 μ L	20 μ L

A cuba de eletroforese (Mini-PROTEAN[®] II – Bio-Rad) foi montada com as placas de vidro, e seguiu-se a preparação do gel. Primeiramente foi realizada a polimerização do gel separador, preenchendo aproximadamente 2/3 da placa, e adicionou-se água destilada para linearizar o gel separador e retirar as bolhas. Após a polimerização, a água destilada foi descartada e o sistema foi seco com papel de filtro. Em seguida, foi realizada a polimerização do gel concentrador. Após a polimerização, a cuba foi preenchida com tampão de corrida tris-glicina 1X e os poços do gel foram lavados exaustivamente com o mesmo a fim de retirar resíduos de poliacrilamida não polimerizada. As amostras de proteínas foram fervidas em tampão de amostra 2X por 5 minutos, e aplicadas no gel. A eletroforese procedeu até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, saísse da placa. Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em um recipiente de vidro com fundo plano, coberto com a solução corante e mantido sobre agitação durante uma noite. Posteriormente, o gel foi lavado com solução descorante, e mantido nessa solução sob agitação até que fosse possível a visualização das bandas protéicas. A solução descorante foi trocada sempre que atingisse a saturação com o corante. Para todas as corridas de eletroforese de SDS-PAGE, foi utilizado o

marcador de massa molecular Precision Plus ProteinTM (Bio-Rad) como padrão para a análise do tamanho das bandas observadas.

3.12 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, considerando a amostra normal para o valor $p < 0,05$. Essas análises foram realizadas utilizando o software Past (versão 2.15), disponível em <http://nhm2.uio.no/past/download.html>. As análises estatísticas foram realizadas com o software *Graphpad Prism* (versão 5.0). Os dados estão apresentados como médias +/- SEM (erro padrão da média). A comparação estatística entre as amostras foi realizada utilizando o método estatístico de análise de variância (1-way ANOVA) com pós-teste de comparação de médias de Tukey.

IV – RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise de *P. echinulatum* por meio de microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de meio ágar-dextrose-batata (BDA), contendo conídios de *P. echinulatum*, foram processados para a análise em microscópio eletrônico de varredura. Os conídios e hifas de *P. echinulatum* apresentam superfície de aspecto áspero (Figura 26), característica morfológica pela qual a espécie foi primeiramente descrita no clássico manual das espécies do gênero *Penicillium* (Raper & Thom, 1949). Os conídios possuem aspecto globoso a subgloboso e diâmetro entre 3,5 a 5 μm .



Figura 26. Eletromicrografia de varredura dos esporos de *P. echinulatum* crescido em meio BDA. Aumento de 7500X.

Na figura 27, são observados, em maior detalhe, diversos conídios em processo de germinação e produção de hifas. As hifas dessa espécie apresentam septação e ramificação (indicado no detalhe da figura 27). O aspecto rugoso e a septação das hifas de *P. echinulatum* também são observados na figura 28.



Figura 27. Eletromicrografia de varredura dos conídios em processo de germinação e de hifas de *P. echinulatum*. As setas verdes indicam a septação das hifas do fungo. A circunferência vermelha destaca a ramificação da hifa. Aumento de 1900X.



Figura 28. Eletromicrografia de varredura do micélio de *P. echinulatum*. O fungo foi cultivado por 24h em meio composto por glicose 3% como única fonte de carbono. As setas verdes indicam septação das hifas. Aumento de 1800X.

4.1.1 Cultivo de *P. echinulatum* sobre bagaço de cana-de-açúcar

Esse experimento foi realizado com o objetivo de analisar o crescimento e a atividade enzimática de *P. echinulatum* sobre diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar por meio de observação em microscópio eletrônico de varredura. Foram realizados cultivos de *P. echinulatum* com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor e bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Conídios de *P. echinulatum* foram inoculados em meios contendo bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (0,1%) ou bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (0,1%) como única fonte de carbono. Os cultivos submersos foram realizados em shaker com rotação lenta (90rpm) com o intuito de formar grumos compactos entre o fungo e os substratos utilizados. As amostras foram processadas para a observação em microscópio eletrônico de varredura como descrito na seção 3.3. A condição controle desse experimento foi constituída pelo meio de cultura, sem a presença de *P. echinulatum*.

Tanto o bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor como *in natura* apresentaram, nas condições de incubação realizadas, uma superfície lisa e íntegra sob a análise em microscópio eletrônico de varredura. (Figuras 29 e 32).

Por outro lado, o crescimento de *P. echinulatum* sobre e no interior dos substratos utilizados ocasionou a fragmentação, formação de aspecto quebradiço e esfarelado das fibras de bagaço de cana-de-açúcar em vários sítios observados (Figuras 30, 31, 33 e 34).

Não foi observada diferença entre o crescimento ou o nível de degradação do substrato entre os dois períodos observados (120h ou 192h) para os dois substratos utilizados. Até o momento, dentro do conhecimento do autor, essas são as primeiras imagens dessa espécie observadas por microscopia eletrônica de varredura.

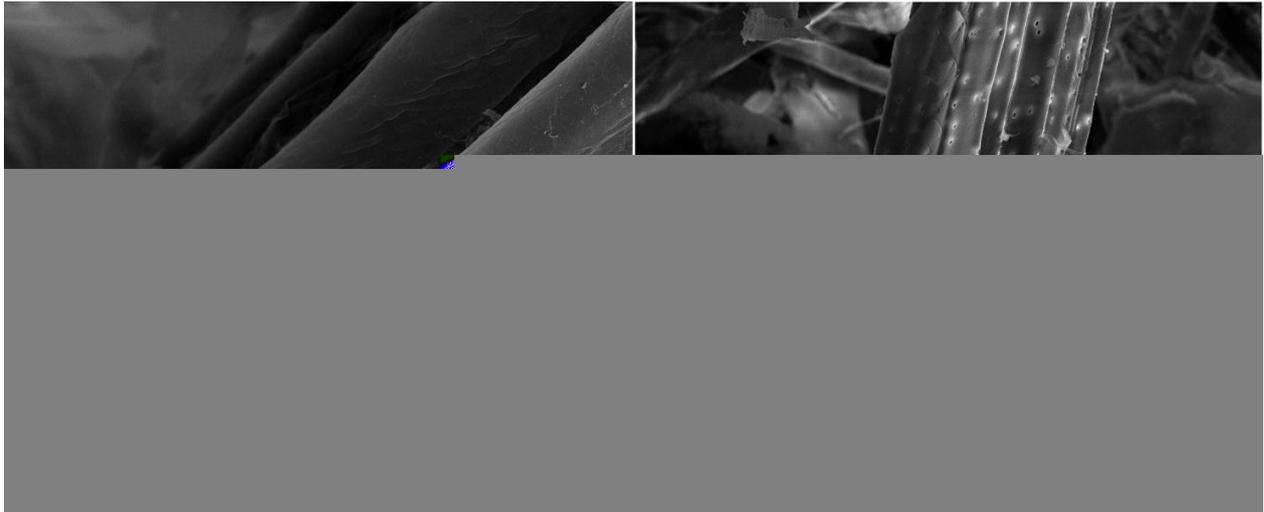


Figura 29. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. O bagaço foi incubado durante 120h (figura à esquerda), ou 192h (figura à direita). Aumentos utilizados: figura à esquerda (2200X) e figura à direita (600X).



Figura 30. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* incubado com conídios de *P.echinulatum* pelo período de 120h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (2700X) e figura à direita (1600X).



Figura 31. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* incubado com conídios de *P.echinulatum* pelo período de 192h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (1600X) e figura à direita (3300X).



Figura 32. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor. O bagaço foi incubado durante 120h (figura à esquerda), ou 192h (figura à direita). Aumentos utilizados: figura à esquerda (650X) e, à direita (2000X).



Figura 33. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor incubado com conídios de *P.echinulatum* pelo período de 120h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (950X) e figura à direita (700X).

Figura 34. Eletromicrografias de varredura de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor incubado com conídios de *P.echinulatum* pelo período de 192h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (650X) e figura à direita (850X).

4.2 Efeito da fonte de carbono sobre a expressão de genes do complexo celulolítico de *P. echinulatum*

Para esse experimento, conídios de *P. echinulatum* foram germinados em cultura submersa, em meios contendo celulose intumescida (1%) ou glicose (1%), como única fonte de carbono, para respectiva indução ou repressão das enzimas do complexo celulolítico. Amostras de micélio foram coletadas em diferentes tempos de cultivo (24h a 144h) e congeladas a -80°C . O RNA total das amostras foi extraído e submetido à análise por qRT-PCR para quantificação do acúmulo de transcritos dos genes de endoglicanase (*egl*), celobiohidrolase (*cbh*) e β -glicosidase (*bgl*), componentes do sistema celulolítico, e a proteína com ação amorfogênica sobre a parede celular vegetal, swolenina (*swo*). A quantificação do acúmulo dos transcritos foi realizada utilizando o gene de actina de *P. echinulatum* como normalizador endógeno. Adicionalmente, o acúmulo de transcritos expressos no primeiro dia de cultivo com glicose para cada gene foi utilizado como condição controle para os cálculos de quantificação relativa dos transcritos.

Observou-se que os genes *egl* e *cbh* apresentaram seu nível de transcritos aumentado quando *P. echinulatum* foi cultivado em meio composto por celulose intumescida (1%) em comparação com o cultivo em condição repressora (glicose 1%) (Figura 35). O perfil de acúmulo de mensageiros desses dois genes se mostrou bastante semelhante ao longo de todo o período de cultivo. Ambos apresentaram baixo acúmulo nas primeiras 24h. A maior quantidade de transcritos foi observada nas amostras coletadas após 48h de cultivo. Para esses genes, foi observado o acúmulo de transcritos, de ordem aproximada de 15000 vezes superior, em relação ao primeiro dia com glicose 1% (Figura 35).

O acúmulo de transcritos desses dois genes decresceu de forma acentuada, até o período de 72h. Um pequeno aumento na quantificação dos transcritos foi observado no período de 96h, em relação ao período anterior observado. Nos dias seguintes, uma redução no nível dos transcritos ocorreu mais lentamente, atingindo baixos níveis nos períodos de 120h e 144h (Figura 35).

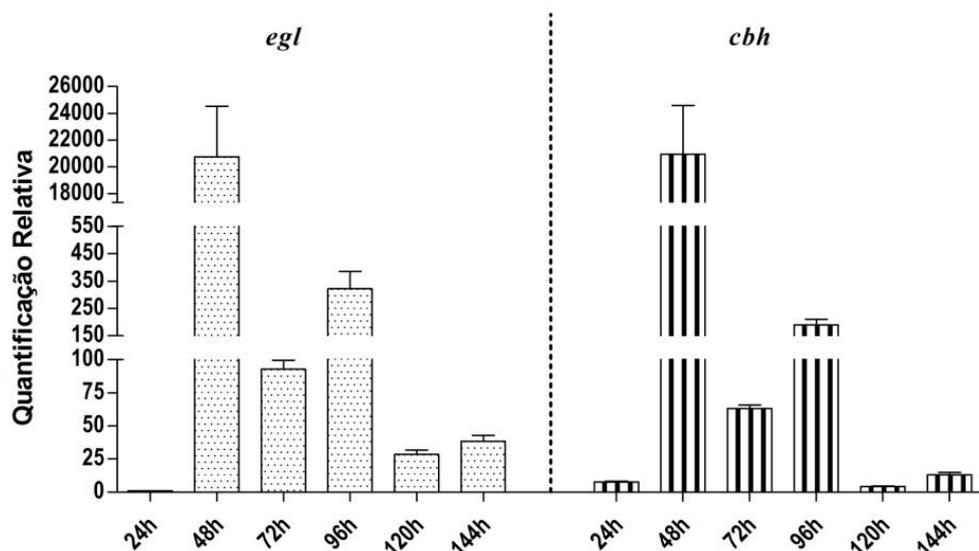


Figura 35. Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes *egl* e *cbh* de *P. echinulatum* por qRT-PCR, cultivo com celulose intumescida 1%. A quantificação relativa dos transcritos está expressa em relação ao *fold change* = 1, em comparação com a expressão do primeiro dia do cultivo em glicose. Os dados estão plotados como média das replicatas e as barras representam o desvio padrão das amostras.

Para o gene de swolenina (*swo*), o padrão de acúmulo de transcritos foi muito semelhante ao dos genes *egl* e *cbh* (Figura 36). Nas primeiras 24h de cultivo, o nível de transcritos desse gene permaneceu baixo. No período de cultivo de 48h, foi observado um aumento do acúmulo de transcritos na ordem aproximada de 15000 vezes. Após 72h de cultivo, houve uma queda do nível de transcritos do gene *swo*, mas em menor grau em relação aos genes *egl* e *cbh* de *P. echinulatum*. Nos últimos dias de cultivo, o nível de transcritos do gene *swo* diminuiu, atingindo patamar mínimo no período de 120h (Figura 36).

Para o gene *bgl* de *P. echinulatum*, o padrão de acúmulo de transcritos observado foi distinto dos genes *egl*, *cbh* e *swo*. O nível de acúmulo de transcritos desse gene manteve-se baixo para todos os períodos de cultivo, em comparação com os outros genes analisados (Figura 36).

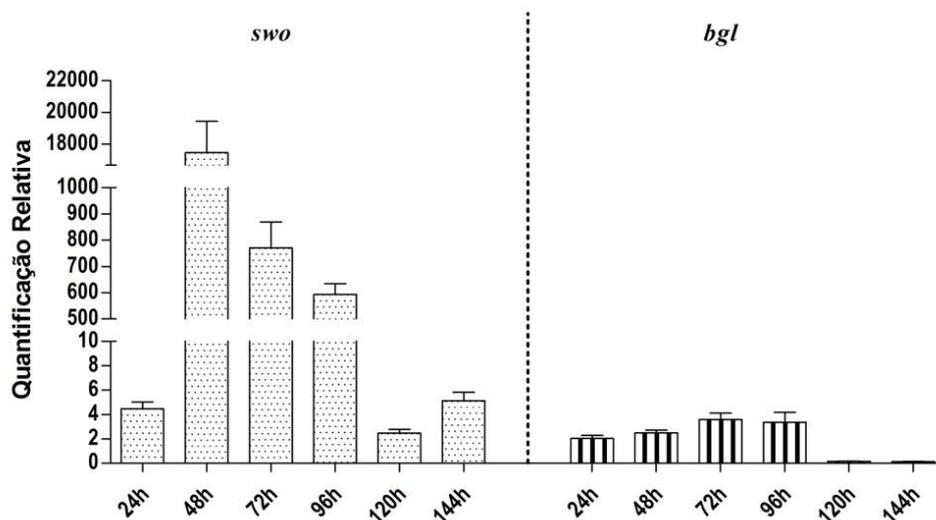


Figura 36. Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes *swo* e *bgl* de *P. echinulatum* por qRT-PCR, cultivo com celulose intumescida 1%. A quantificação relativa dos transcritos está expressa em relação ao *fold change* = 1, em comparação com a expressão do primeiro dia do cultivo em glicose. Os dados estão plotados como média das replicatas e as barras representam o desvio padrão das amostras.

4.3 Análise de *P. echinulatum* por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Esse experimento teve como objetivo avaliar as características ultraestruturais das células de *P. echinulatum* cultivadas em cultura submersa, em condição de indução ou repressão do sistema celulolítico. Conídios do fungo foram inoculados em meios contendo celulose intumescida (1%) ou glicose (3%), como única fonte de carbono. As amostras foram cultivadas em shaker rotatório (180rpm/28°C) e coletadas após o crescimento pelo período de 24h, 72h ou 144h. Imediatamente após, todas as amostras foram processadas, como descrito na seção 3.5, e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.

Nas eletromicrografias analisadas, foi possível observar aspectos ultraestruturais das células do fungo *P. echinulatum*, tais como parede celular, membrana nuclear, septação de hifas, nucléolo e organelas celulares, tais como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Até o momento, dentro do conhecimento do autor, essas são as primeiras imagens dessa espécie observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Nas amostras coletadas referentes ao primeiro dia de cultivo, não foram observadas diferenças notáveis entre a ultraestrutura das células de *P. echinulatum* em condições de indução ou repressão do sistema celulolítico (Figura 37).

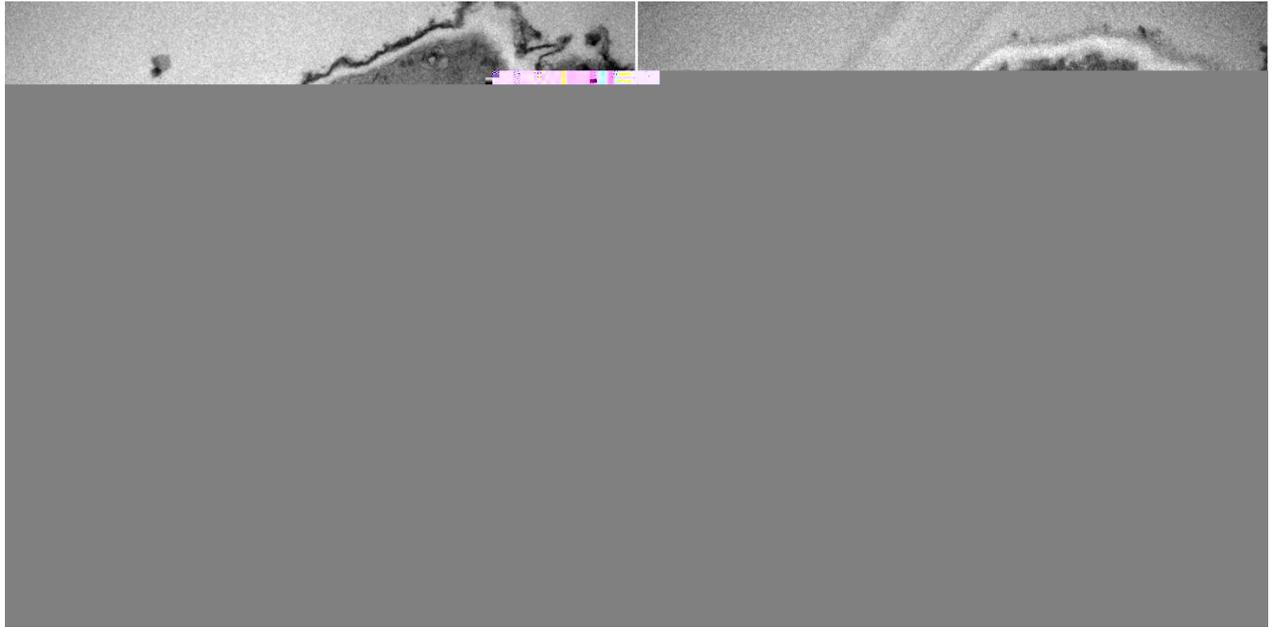


Figura 37. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de *P. echinulatum* cultivadas em glicose 3% (esquerda) ou celulose intumescida 1% (direita) pelo período de 24h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (25000X) e figura à direita (30000X).

Por outro lado, o micélio cultivado em celulose intumescida pelo período de 72h (Figura 38) apresenta retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, ocupando todo o volume celular, o que não se observa na amostra de glicose. A alteração ultraestrutural observada é condizente com uma célula com elevada função de produção e secreção de proteínas.

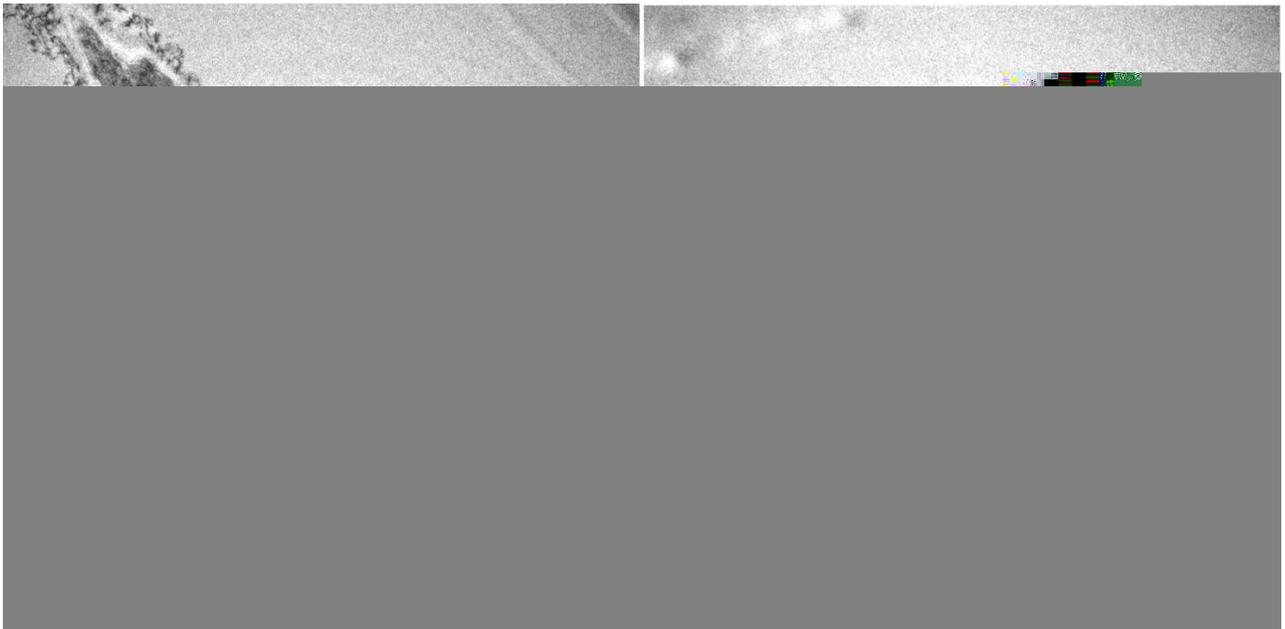


Figura 38. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de *P. echinulatum* cultivadas em glicose 3% (esquerda) ou celulose intumescida 1% (direita) pelo período de 72h. Aumentos utilizados: figura à esquerda (15000X) e figura à direita (40000X).

Semelhantemente às amostras coletadas no período de 24h, não foram observadas diferenças na ultraestrutura celular entre as amostras de glicose (3%) e celulose intumescida (1%), coletadas após cultivo por 144h (Figura 39).



Figura 39. Eletromicrografias de transmissão de amostras miceliais de *P. echinulatum* cultivadas em glicose 3% (esquerda) ou celulose intumescida 1% (direita) pelo período de 144h. A figura da esquerda apresenta espessa parede celular e septação da hifa. Aumentos utilizados: figura à esquerda (20000X) e figura à direita (25000X).

4.4 Testes de crescimento na presença de drogas moduladoras da estrutura da cromatina

Esses testes foram realizados com o objetivo de se determinar as concentrações ótimas das drogas modificadoras da estrutura da cromatina Tricostatina A (TSA), Butirato de Sódio (NaBut) ou 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA) que seriam utilizadas nos experimentos seguintes, nos cultivos em cultura submersa de *P. echinulatum* para a quantificação do nível de transcritos relacionados ao sistema celulolítico e avaliação das proteínas dos sobrenadantes de cultura em SDS-PAGE e ensaios enzimáticos.

Para esse experimento, 500 conídios de *P. echinulatum* (contados em câmara de Neubauer) foram inoculados no centro de placas de Petri pequenas (48mm de diâmetro), contendo 10mL de meio BDA na presença, ou ausência (condição controle), das drogas Tricostatina A (TSA), Butirato de sódio (NaBut) e 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA), em diversas concentrações. O diâmetro dos halos de crescimento do fungo foi mensurado pelo

período de 48 à 144h, ou até o preenchimento total da superfície do meio pelo crescimento do fungo (Figura 40).

As concentrações das drogas foram escolhidas pelo critério de não afetar, ou afetar minimamente, o crescimento do fungo, em relação aos cultivos da condição controle (ausência de droga). Sabidamente, todos os compostos utilizados possuem ação antiproliferativa (revisto por Mai & Altucci, 2009). Além disso, a inibição do crescimento de *P. echinulatum* pode constituir uma medida indireta da diminuição da capacidade total de produção enzimática, o que conferiria uma situação totalmente indesejável para o cultivo de um organismo de interesse industrial.



Figura 40. Análise de crescimento do fungo *P. echinulatum* em cultura sólida na presença de drogas modificadoras da estrutura da cromatina.

A partir dos testes de crescimento, foram escolhidas as seguintes concentrações de uso para as drogas: TSA = 0,25 μ M; 5-AZA = 25 μ M e NaBut = 1mM. Essas concentrações foram utilizadas para o cultivo de *P. echinulatum* em cultura submersa e posterior análise do nível de transcritos de genes do sistema celulolítico e da atividade enzimática dos sobrenadantes de

cultura. Posteriormente, as mesmas análises foram realizadas com concentrações menores das drogas: TSA = 25nm; 5-AZA = 2,5µM e NaBut = 10µM.

Adicionalmente, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada no peso úmido das amostras miceliais cultivadas com as diferentes doses das drogas, em relação aos grupos não tratados (Figura 41).

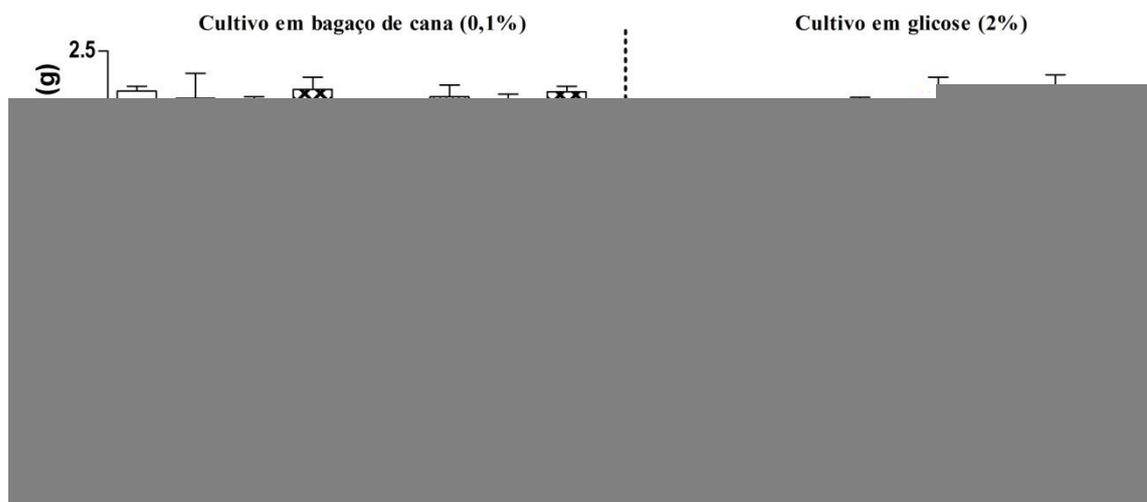


Figura 41. Análise comparativa do peso úmido micelial de *P. echinulatum*. Os dados estão plotados como média da triplicata com o desvio padrão. Todas as amostras foram comparadas com seu respectivo grupo controle. Não foi observada qualquer diferença estatística significante para $p < 0,05$.

4.5 Efeito de moduladores epigenéticos sobre o nível de transcritos de genes do complexo celulolítico de *P. echinulatum*

Esse experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a ação de moduladores epigenéticos (TSA, 5-AZA e NaBut) sobre o acúmulo transcritos dos genes *egl*, *cbh*, *bgl* e *swo* de *P. echinulatum*, em condições indutoras ou repressoras de seu sistema celulolítico.

Para esse experimento, conídios de *P. echinulatum* (10^8 esporos/mL de meio) foram inoculados em meio mínimo (composição descrita no item 3.2.4) com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (BCA) ou glicose, como única fonte de carbono. O micélio foi incubado em shaker durante 72h (180rpm/28°C) para germinação dos conídios e desenvolvimento micelial inicial. Após esse período, foram administradas as drogas TSA ($[]_{\text{final}} = 0,25\mu\text{M}$), NaBut ($[]_{\text{final}} = 1\text{mM}$) ou 5-AZA ($[]_{\text{final}} = 25\mu\text{M}$) no meio de cultura e a incubação das amostras procedeu nas mesmas condições por 48h adicionais. A condição controle consistiu no cultivo do fungo sem administração de qualquer substância. As amostras

de micélio de *P. echinulatum* foram coletadas e o RNA total das amostras foi extraído como descrito na seção 3.4. As amostras de RNA total foram então submetidas à qRT-PCR para avaliar o acúmulo de transcritos dos genes anteriormente citados. A quantificação do nível dos transcritos foi calculada como descrito no item 3.4. O nível de acúmulo de transcritos do cultivo com glicose 2% e na ausência de droga foi utilizado como condição controle para o cálculo de quantificação relativa (*fold change*) do nível de transcritos de genes de celulase.

Nesse experimento, em condições de indução, o acúmulo de transcritos do gene *egl* teve seu nível reduzido nos tratamentos com a droga TSA e NaBut em relação ao grupo cultivado na ausência de droga. Para o gene *cbh*, a diminuição do acúmulo de transcritos só foi observada na presença da droga NaBut. Nenhuma alteração do acúmulo de transcritos para o gene *bgl* foi observada na presença dos moduladores da estrutura da cromatina. Semelhantemente ao gene *egl*, também foi observado a diminuição do acúmulo de transcritos do gene *swc* na presença das drogas TSA e NaBut (Figura 42).

No cultivo de *P. echinulatum* em condições repressoras do sistema celulolítico (glicose 2%), não foi observada diferença para o acúmulo de transcritos para todos os tratamentos e todos os genes analisados, quando comparado ao grupo controle (Figura 42).

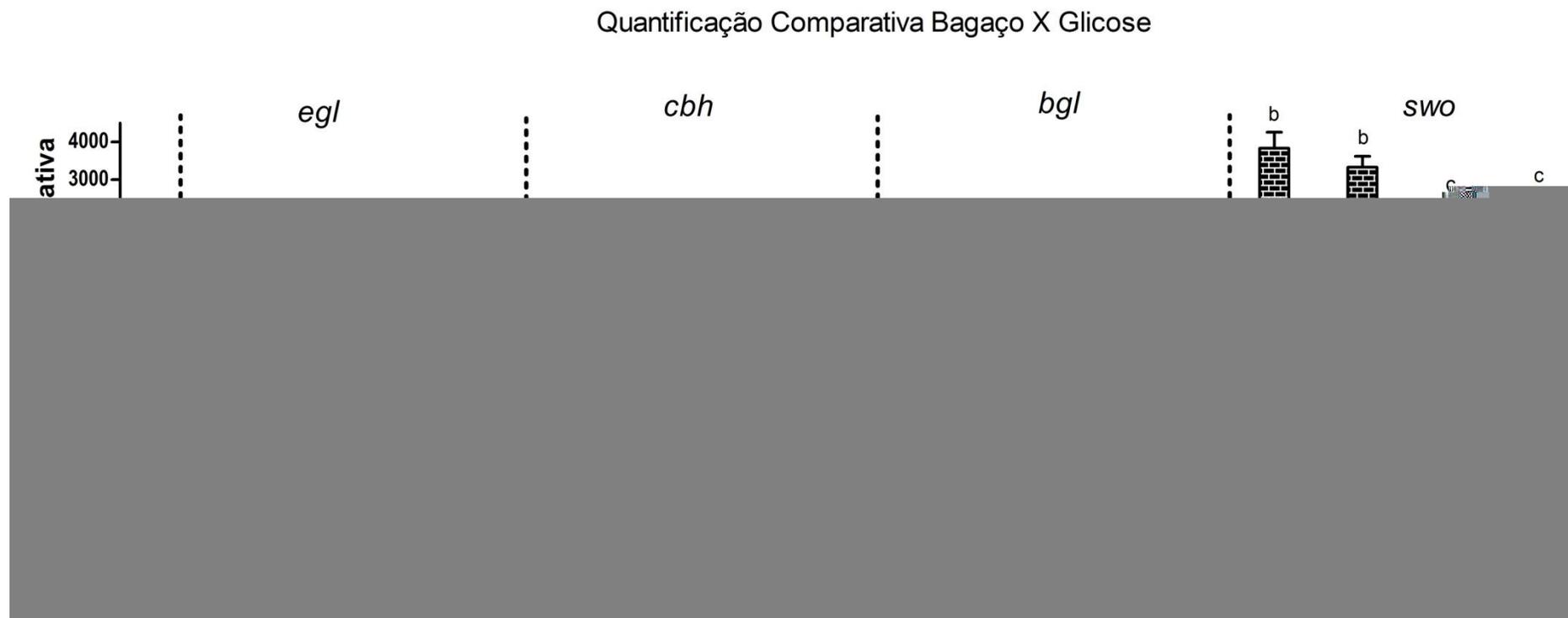


Figura 42. Quantificação comparativa do nível dos transcritos dos genes *egl*, *cbh*, *bgl* e *swo* de *P. echinulatum* por qRT-PCR entre os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor 0,1% (BCA) e glicose 2% na presença de moduladores epigenéticos (maiores concentrações utilizadas). O acúmulo de transcritos no cultivo com glicose 2% e na ausência de droga foi utilizado como controle (*fold change* = 1). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Letras iguais representam médias estatisticamente equivalentes ($p < 0,05$).

O acúmulo dos transcritos desses genes também foi verificado em cultivos com concentrações menores das drogas modificadoras da estrutura da cromatina (5-AZA = 2,5 μ M; TSA = 25nM; NaBut = 10 μ M) (Figuras 43).

Nessas condições e no cultivo em condição indutora do sistema celulolítico, foi observada a alteração do acúmulo apenas dos transcritos dos genes *egl* e *swo* (Figura 43). O acúmulo de transcritos dos genes *egl* e *swo* se mostrou alterado (redução) quando o fungo foi incubado com a droga TSA. Não foi observada diferença entre o acúmulo de transcritos desses genes, quando o fungo foi cultivado com NaBut ou 5-AZA, em relação com o grupo controle. Nenhuma alteração do acúmulo de transcritos para os genes *cbh* e *bgl* foi observada na presença dos moduladores da estrutura da cromatina.

No cultivo de *P. echinulatum* em condições repressoras do sistema celulolítico (glicose 2%), não foi observada diferença para o acúmulo de transcritos para todos os tratamentos e todos os genes analisados, quando comparado ao grupo controle (Figura 43).



Figura 43. Quantificação comparativa do nível dos transcritos dos genes *egl*, *cbh*, *bgl* e *swo* de *P. echinulatum* por qRT-PCR entre os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor 0,1% (BCA) e glicose 2% na presença de moduladores epigenéticos (menores concentrações utilizadas). O acúmulo de transcritos no cultivo com glicose 2% e na ausência de droga foi utilizado como controle (*fold change* = 1). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Letras iguais representam médias estatisticamente equivalentes ($p < 0,05$).

4.6 Ensaios enzimáticos

Esses experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a atividade hidrolítica presente nos sobrenadantes da cultura de *P. echinulatum*, empregando-se substratos celulósicos (papel de filtro e CMC) e xilana (oat spelt), por meio de ensaios colorimétricos utilizando o reagente DNS para a detecção da formação de açúcares redutores (Miller, 1959). Os ensaios de atividade de celulase total e de atividade de endoglicanases (CMCase) foram realizados seguindo-se o protocolo de Ghose (1987), com alterações. Para os ensaios de xilanase total, foi utilizado o protocolo descrito por Filho *et al.*, (1993), com alterações. A metodologia dos experimentos está descrita em maiores detalhes na seção 3.9.

4.6.1 Ensaio de FPase

Esse experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade de celulase total presente nos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum*, cultivado com diferentes fontes de carbono e na presença de moduladores epigenéticos. Esse ensaio utiliza tiras de papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 0,6cm, aprox. 5mg) como substrato. Esse tipo de papel de filtro é constituído exclusivamente por celulose e se apresenta como substrato ideal para a avaliação da atividade de endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases, atuando conjuntamente.

Esse ensaio revelou atividade enzimática semelhante dos sobrenadantes de cultura nos cultivos com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor ou glicose como única fonte de carbono, para todas as concentrações das drogas utilizadas. A atividade enzimática está representada como unidades internacionais/mL de reação (UI = μmol de glicose/min) (Figuras 44 e 45).

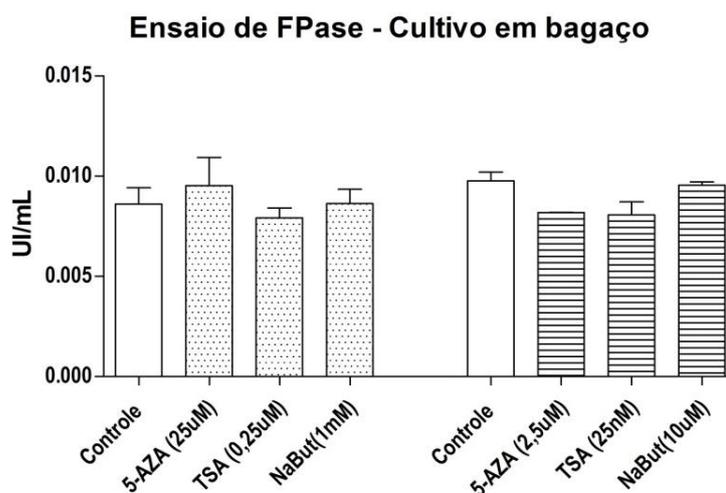


Figura 44. Ensaio de atividade de FPase dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (bagaço de cana 0,1%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

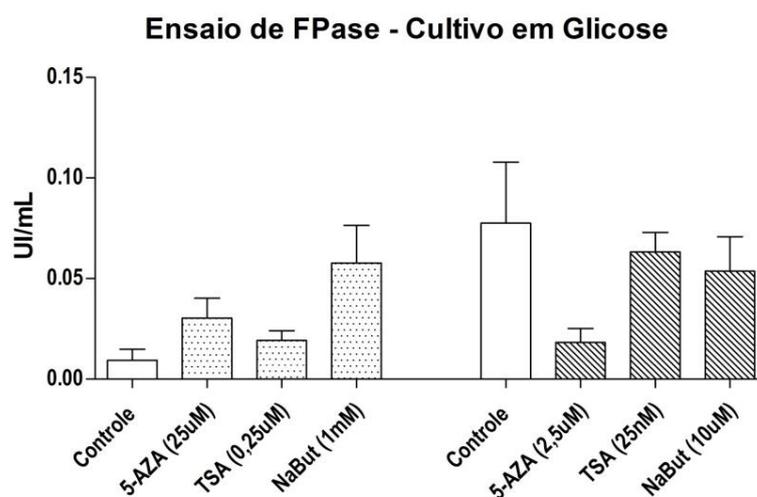


Figura 45. Ensaio de atividade de FPase dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (glicose 2%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

4.6.2 Ensaio de CMCase

Esse experimento tem como objetivo avaliar a atividade enzimática, preferencialmente das enzimas endoglicanases, dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum*, cultivado com diferentes fontes de carbono e na presença de moduladores epigenéticos. Esse ensaio utiliza carboximetilcelulose (CMC) como substrato, um derivado sintético de celulose que possui

grupos carboximetil em substituição aos grupos hidroxil dos monômeros de glicose. Tal modificação química aumenta a área de regiões amorfas ao longo da cadeia polimérica, ideais para a ação de endoglicanases.

Esse ensaio revelou atividade semelhante dos sobrenadantes de cultura nos cultivos com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor ou glicose como única fonte de carbono, para todas as concentrações das drogas utilizadas. A atividade enzimática está representada como unidades internacionais/mL de reação (UI = μmol de glicose/min) (Figuras 46 e 47).



Figura 46. Ensaio de atividade de CMCase dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (bagaço de cana 0,1%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

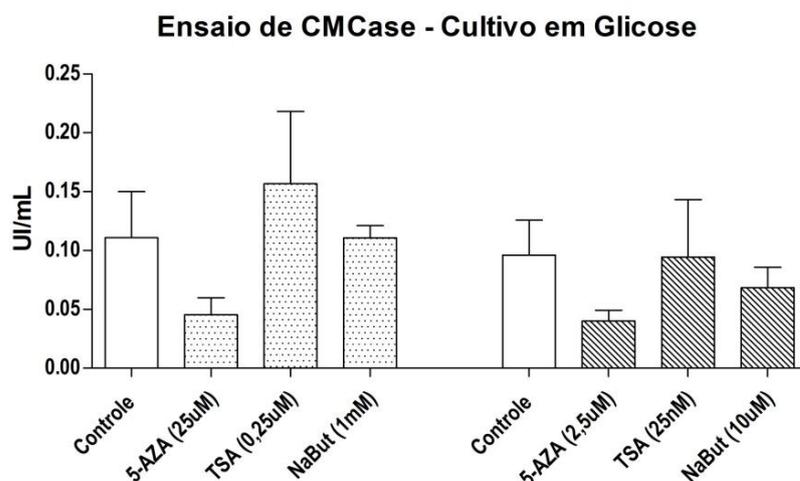


Figura 47. Ensaio de atividade de CMCase dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (glicose 2%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

4.6.3 Ensaio de Xilanase total

Esse ensaio teve como objetivo avaliar a atividade enzimática de xilanases presente nos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum*, cultivado com diferentes fontes de carbono e na presença de moduladores epigenéticos. Esse ensaio utilizou xilana *oat spelt* (1%) como substrato.

A atividade de xilanase total também se mostrou semelhante nos sobrenadantes de cultura nos cultivos com bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor ou glicose como única fonte de carbono, para todas as concentrações das drogas utilizadas. A atividade enzimática está representada como unidades internacionais/mL de reação (UI = μmol de xilose/min) (Figuras 48 e 49).

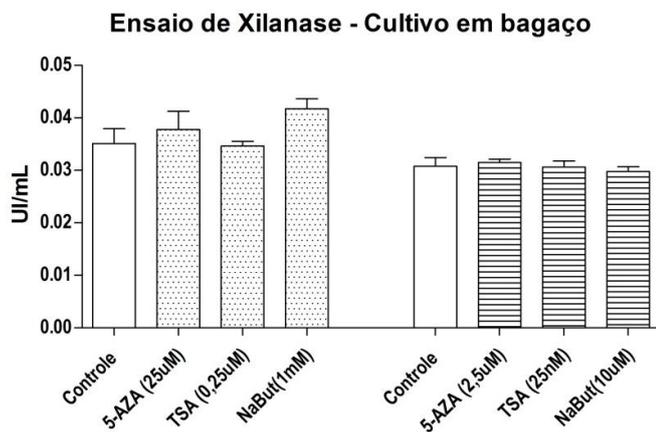


Figura 48. Ensaio de atividade de xilanase total dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (bagaço de cana 0,1%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

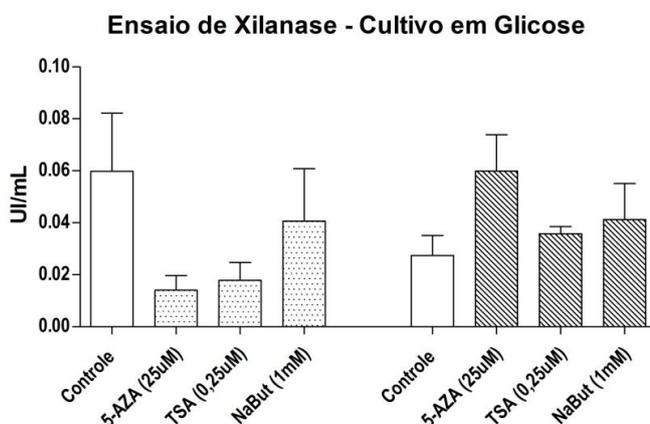


Figura 49. Ensaio de atividade de xilanase total dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* (glicose 2%). Os dados estão representados como a média das triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média. Não foi observada qualquer diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

O perfil proteico dos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* foi analisado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Como descrito na seção **3.10**, 4mL dos sobrenadantes de cada cultura foram incubados com 1mL ácido tricloroacético (100%) para a precipitação de proteínas. Após a precipitação, as amostras foram ressuspensas com tampão de amostra para proteína 2X, fervidas por 5min e submetidas à eletroforese. Logo após, os géis foram corados com azul brilhante de Comassie R-250 e descorados até a visualização das bandas proteicas.

Nos cultivos com bagaço de cana, os sobrenadantes de cultura do fungo *P. echinulatum* apresentaram maior secreção de proteínas em relação aos cultivos com meios compostos de glicose como única fonte de carbono. Na condição indutora, foi observado um perfil definido de quatro bandas proteicas: uma banda de grande intensidade de massa molecular de aproximadamente 60-70kD e três bandas de menor intensidade com aproximadamente 100kD, 55kD e 50kD (Figura 50). Esse perfil não foi observado nas amostras dos cultivos com glicose (Figura 51), sugerindo que as bandas apresentadas no primeiro grupo de géis sejam representativas de proteínas responsáveis pela degradação do material lignocelulósico presente no meio de cultura.

O perfil de bandas apresentado no cultivo com bagaço de cana é caracterizado por uma banda de grande intensidade de massa molecular de aproximadamente 60-70kD, e outras bandas de com aproximadamente 100kD, 55kD e 50kD, de menor intensidade.

O perfil de proteínas observado não sofreu alteração com a utilização de drogas que agem sobre a estrutura da cromatina, em relação ao grupo controle.

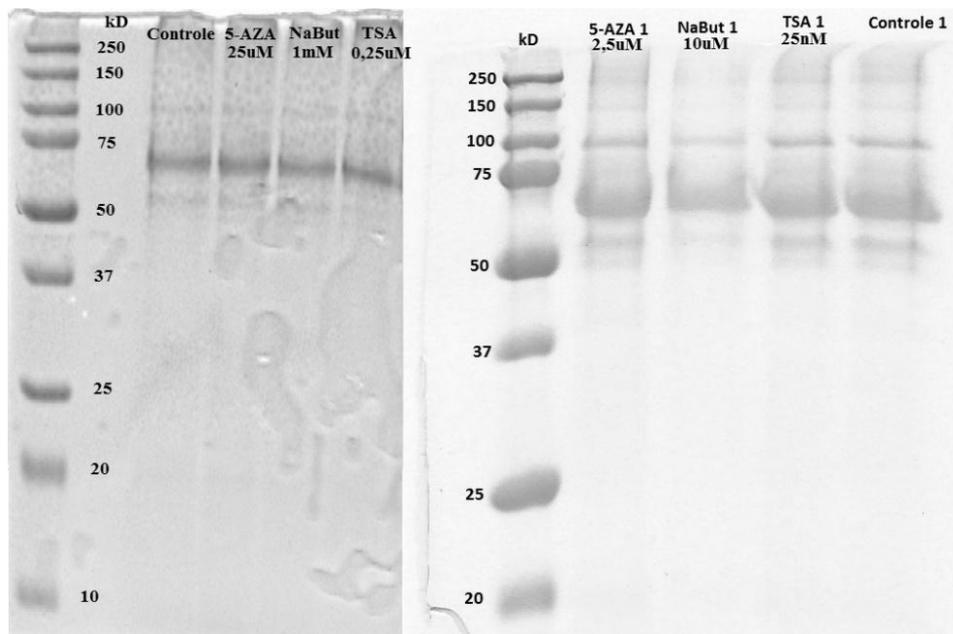


Figura 50. Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de amostras do sobrenadante do cultivo de *P. echinulatum* em bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor 0,1%. No lado esquerdo, está o gel referente às maiores doses de drogas utilizadas. No lado direito, as doses menores. Os grupos experimentais estão indicados na figura. Marcador de massa molecular usado: Precision Plus Protein™ (Bio-Rad).

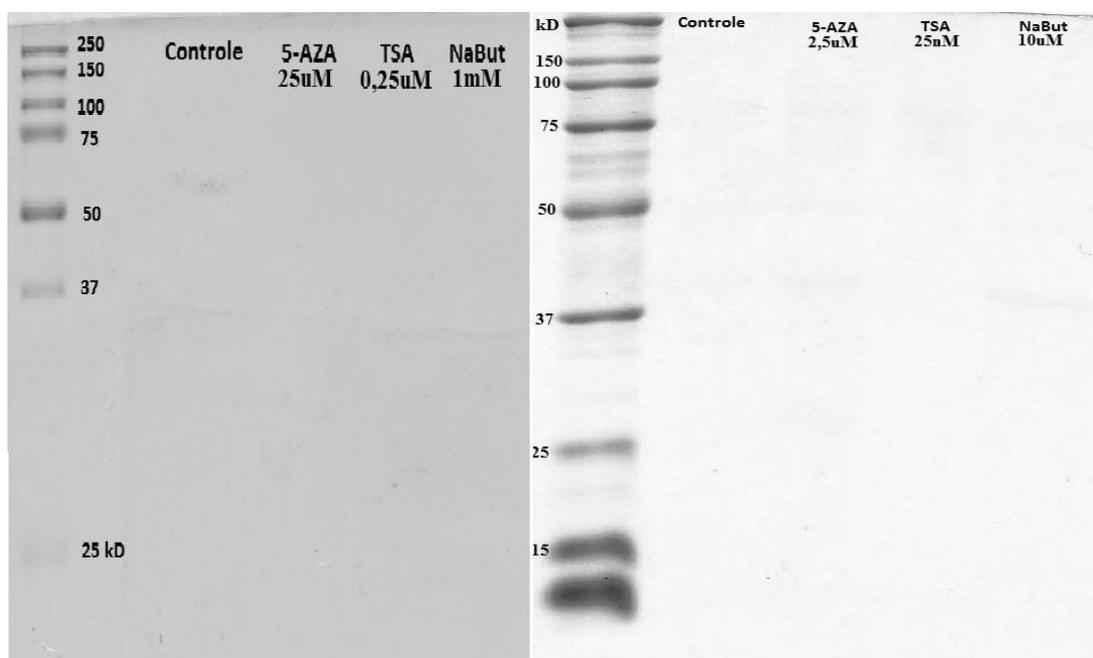


Figura 51. Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de amostras do sobrenadante do cultivo de *P. echinulatum* em glicose 2%. No lado esquerdo, está o gel referente às maiores doses de drogas utilizadas. No lado direito, as doses menores. Os grupos experimentais estão indicados na figura. Marcador de massa molecular usado: Precision Plus Protein™ (Bio-Rad).

V – DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O uso da microscopia eletrônica de varredura para a análise do crescimento microbiano e da atividade enzimática sobre substratos lignocelulósicos apresenta-se como uma interessante abordagem para os estudos de bioconversão. A análise do crescimento de *P. echinulatum* sobre bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor ou *in natura* por meio de microscopia eletrônica de varredura revelou que o crescimento desse fungo sobre e no interior do substrato ocasionou a fragmentação e rompimento da estrutura das fibras do bagaço, em comparação com o substrato não incubado com *P. echinulatum*. O provável mecanismo para a geração do perfil de degradação observado está relacionado à ação física do crescimento do fungo sobre o substrato e sua ação enzimática hidrolítica, uma vez que o fungo foi capaz de crescer nos meios contendo uma fonte lignocelulósica como única fonte de carbono. Como demonstrado anteriormente, essa linhagem de *P. echinulatum* apresenta grande produção de enzimas hidrolíticas, tais como celulasas e xilanases. O nível de produção dessas enzimas é comparado com linhagens do fungo *T. reesei*, conhecido como um dos organismos de maior atividade hidrolítica descrito pela literatura científica (Martins *et al.*, 2008). Adicionalmente, *P. echinulatum* apresenta elevada produção enzimática quando incubado com substratos naturais (Camassola & Dillon, 2010). Uma vez que a microscopia de varredura revelou uma eficiente colonização e degradação do substrato, *P. echinulatum* é apontado como um promissor agente para a bioconversão do bagaço de cana de açúcar.

A microscopia de varredura também revelou que os conídios da linhagem utilizada nesse trabalho apresentam formato globoso a subgloboso e diâmetro entre 3,5 a 5 μm . Foram observados também diversos conídios em processo de germinação e a formação de hifas. A análise ultraestrutural das hifas demonstrou septação e ramificação. Tais informações são úteis para a confirmação taxonômica e também colaboram na compreensão da biologia do microrganismo.

Nesse trabalho, foi observado o acúmulo de transcritos de genes de celulasas de *P. echinulatum* incubado em condições de indução e repressão. Nas primeiras 24h de cultivo com celulose intumescida, o acúmulo de transcritos dos genes *cbh*, *egl* e *swo* apresentou baixos níveis, sugerindo a presença de celulasas basais, responsáveis pelo reconhecimento e degradação inicial do substrato para a formação de moléculas menores solúveis, que induzem a expressão de celulasas (revisito por Aro *et al.*, 2005). Tal baixo nível poderia também

representar o início da indução da transcrição propriamente dita. Após o pico de acúmulo de transcritos para os genes *cbh*, *egl* e *swo*, ocorrido no período de 48h de cultivo (indução da expressão de celulases devido ao reconhecimento de substrato celulósico no meio de cultura), os níveis desses transcritos diminuíram até atingirem patamares mínimos nos últimos períodos de análise. A redução dos transcritos desses genes sugere repressão do sistema celulolítico por subprodutos da degradação da celulose, como a celobiose e a glicose. Também é possível que essa diminuição represente uma baixa atividade metabólica devida à depleção da fonte de carbono (revisado por Aro *et al.*, 2005).

Apesar de não ser uma celulase, o padrão de expressão de transcritos do gene *swo* se mostrou semelhante ao dos genes *cbh* e *egl*. Conforme já descrito na literatura, a expressão desse gene em outras espécies de fungos filamentosos ocorre concomitantemente à das celulases. A expressão de *swo* é normalmente induzida por fontes celulósicas e inibida na presença de glicose (Saloheimo *et al.*, 2002). O aumento do nível de transcritos desse gene no mesmo período dos genes *egl* e *cbh* indica uma orquestração do sistema celulolítico em *P. echinulatum*, o que possibilitaria um maior rendimento de sacarificação do polímero de celulose, haja vista a ação sinérgica da proteína swolenina com celulases para o aumento da produção de açúcares redutores (Wang *et al.*, 2010; Jäger *et al.*, 2011).

A análise do micélio de *P. echinulatum* por meio de microscopia eletrônica de transmissão revelou, após 72h de cultivo com celulose como de carbono, ultraestrutura característica de uma célula com função de produção e secreção de proteínas acentuada, com retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e grânulos de secreção. Como as celulases e a swolenina agem sobre o substrato presente no meio de cultura, é necessária a sua secreção. A produção de celulases requer alterações de toda a maquinaria transcricional, traducional e secretora das células de *P. echinulatum*, nas condições de cultivo empregadas, a ponto de induzir as alterações ultraestruturais observadas, quando em comparação com o grupo cultivado com glicose, que é uma molécula prontamente disponível para a geração de energia.

O padrão de acúmulo de transcritos do gene *bgl* de *P. echinulatum* foi diferente daquele das demais celulases e da swolenina, apresentando baixos níveis ao longo de todo o período de cultivo do fungo. A não indução do gene *bgl* em presença de celulose já foi descrita em outras espécies de fungos filamentosos. A espécie *A. nidulans*, na presença de moléculas de celobiose (substrato para a enzima β -glicosidase), não apresenta indução da expressão do gene, em comparação com o cultivo do fungo sem qualquer fonte de carbono

(Lee *et al.*, 1996). Adicionalmente, a espécie *T. reesei* apresenta aumento modesto na indução da expressão de *bgl* quando incubado com celulose (Margolles-Clark *et al.*, 1997).

Nos testes de crescimento de *P. echinulatum* em cultura sólida em presença das drogas moduladoras da estrutura da cromatina, foram estabelecidas as concentrações que seriam utilizadas para os experimentos de quantificação do acúmulo de transcritos de celulasas e dos ensaios enzimáticos com os sobrenadantes de cultura. As concentrações de uso definidas nesse teste foram próximas às concentrações utilizadas em estudos com células de mamífero em cultura e fungos filamentosos como *A. nidulans* e *A. niger*, em experimentos com objetivos distintos dos nossos (Shwab *et al.*, 2007; Fisch *et al.*, 2009; Mai & Altucci, 2009). As doses menores das drogas foram utilizadas devido ao fato de os testes de crescimento terem sido realizados somente em condições de cultura sólida, condição distinta da empregada para os experimentos de biologia molecular e de enzimologia. Ressalta-se que a aferição do peso úmido das amostras miceliais não revelou diferença significativa entre os grupos tratados e os grupos controle; assim, eventuais diferenças nos níveis de transcritos ou na atividade enzimática representariam o efeito das drogas sobre a maquinaria de transcrição/tradução, e não um efeito relacionado à inibição do crescimento.

Embora haja poucos estudos a respeito, a manipulação epigenética de fungos filamentosos já foi indicada como uma possível metodologia para a geração de produtos naturais sintetizados por vias biossintéticas silenciadas (Fisch *et al.*, 2009). Assim como a produção de mutantes por genética clássica ou molecular, essa abordagem pode representar uma alternativa para a modificação de microrganismos que atendam a diversas necessidades industriais.

Grande parte das substâncias que atuam modificando a estrutura da cromatina é utilizada para a terapia do câncer ou possui enorme potencial para esse uso. Isso se deve ao fato de que esses compostos apresentam atividade antiproliferativa, por meio da regulação epigenética da produção de fatores de crescimento, de genes pró-apoptóticos, de genes responsáveis pelo ciclo celular, entre outros (Glaser, 2007). Dessa maneira, a ação dessas substâncias ocorre por meio da indução e repressão de diferentes genes.

Embora diversos estudos apontem as drogas com atividade sobre a estrutura da cromatina como moléculas que estimulam a expressão gênica, a ação dessas drogas ainda se mostra controversa e muito mais complexa do que pensávamos, em termos da expressão individual de genes. Como exemplo, a análise do nível de transcritos de diversos genes em *A. niger* apresentou tanto repressão quanto indução da expressão, quando tratado com

substâncias de efeito inibitório sobre histonas desacetilases ou DNA metiltransferases (Fisch *et al.*, 2009). A incubação da levedura *S. cerevisiae* com a droga Tricostatina A resultou tanto na indução quanto na repressão da expressão de diversos genes relacionados ao ciclo celular e ao metabolismo de aminoácidos e carboidratos (Bernstein *et al.*, 2000).

No cultivo do fungo em bagaço de cana explodido a vapor, com as maiores concentrações dos moduladores epigenéticos, foi observado que as drogas TSA e NaBut causaram a diminuição do acúmulo de transcritos de todos os genes analisados, com exceção do gene *bgl*, que não teve os níveis de expressão alterados em nenhum dos tratamentos empregados. TSA e NaBut atuam por inibição da atividade de enzimas da classe das histonas desacetilases (revisito por Mai & Altucci, 2009). Como resultado, a ação dessas drogas ocasiona a hiperacetilação das histonas do DNA, o que possibilita o relaxamento da estrutura da cromatina e facilita o acesso de complexos transcricionais e reguladores da transcrição (Gregory *et al.*, 2001). Por atuarem em nível global, a redução do acúmulo de transcritos desses genes poderia ser atribuída ao aumento da expressão de reguladores negativos da transcrição desses genes, causando então a diminuição do nível de transcritos.

Demonstramos ainda, no cultivo com celulose intumescida, que os genes *cbh*, *egl* e *swo* apresentam hiperindução da transcrição. Em 2003, Zeilinger e colaboradores descreveram o rearranjo nucleossômico sobre o promotor do gene *cbh2* de *Hypocrea jecorina* quando cultivado em condições indutoras. Tal rearranjo ocasionou a exposição do elemento ativador de *cbh2* (CAE), essencial para a expressão do gene na presença de celulose ou de sofrorse. Dessa maneira, a indução de celulasas por substratos celulósicos parece induzir, por si só, modificações na estrutura da cromatina, favorecendo a expressão gênica. Uma vez que as celulasas analisadas (exceto *bgl*) têm a sua expressão regulada de maneira semelhante, é possível que substâncias como a TSA e o NaBut atuem semelhantemente sobre a transcrição desses genes. Dessa maneira, essas drogas podem estar ocasionando o desbalanço da expressão de genes do complexo celulolítico por meio do possível relaxamento nucleossômico em outras regiões do genoma, gerando a ativação de mecanismos compensatórios, tais como: hiperexpressão de histonas acetiltransferases ou aumento da atividade dessas enzimas.

Observou-se também que os tratamentos com a droga 5-AZA não causaram a alteração no acúmulo de transcritos para todos os genes investigados. A droga 5-AZA apresenta, como mecanismo de ação, a inibição das enzimas DNA-metiltransferases. Sua ação é responsável pela diminuição do grau de metilação do DNA, o que possibilitaria maior

acesso do complexo transcricional às regiões promotoras de diversos genes e, conseqüentemente, o aumento da produção de transcritos (revisto por Mai & Altucci, 2009). Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a metilação do DNA não seja um fator preponderante na regulação da transcrição dos genes analisados.

No cultivo com as menores concentrações das drogas modificadoras da estrutura da cromatina, foi observada que NaBut não mais reduziu o acúmulo de transcritos dos genes *egl*, *swo* e *cbh*. Possivelmente, a concentração menor utilizada do NaBut não tenha sido suficiente para desencadear seu efeito sobre transcrição desses genes, uma vez que se tem descrito na literatura científica que concentrações efetivas para ocasionar a inibição das enzimas histonas desacetilases estejam na faixa poucos milimolares (revisto por Mai & Altucci, 2009), devendo-se sempre considerar as especificidades dos diferentes tipos celulares.

Para o gene *bgl*, nenhum tratamento promoveu alteração significativa do nível de transcritos. O acúmulo de transcritos desse gene demonstrou que, mesmo em condição de indução, os níveis são pouco alterados, indicativo de que seu mecanismo de regulação da expressão possa ser diferente do que ocorre com as demais celulasas. Adicionalmente, os efeitos das drogas utilizadas como a diminuição da metilação do DNA ou afrouxamento da estrutura da cromatina por hiperacetilação das histonas não parecem afetar a transcrição desse gene. Desse modo, nossos dados indicam que a regulação da expressão do gene β -glicosidase em *P. echinulatum* obedeça a mecanismos distintos dos das demais celulasas, inclusive no nível de compactação da cromatina.

Nos cultivos de *P. echinulatum* com glicose e na presença dos moduladores epigenéticos, não foi observada qualquer diferença no acúmulo de transcritos das celulasas analisadas em relação à condição controle (ausência de droga). Este resultado indica a incapacidade dos moduladores, pelo menos nas concentrações estudadas, em reativar a transcrição desses genes em condição de repressão. Adicionalmente, o estudo de Garcia *et al*, (2004) descreve que, em *A. nidulans*, o fator de transcrição CreA seja capaz de efetuar seus efeitos inibitórios sobre a expressão gênica mesmo em condições de abertura total da cromatina. Isto é, o efeito da repressão catabólica, em cultivos com glicose, poderia ocorrer independentemente da presença de drogas modificadoras da estrutura da cromatina.

A não alteração da atividade enzimática de *P. echinulatum*, ou do perfil total de proteínas secretadas, quando do cultivo do fungo com drogas que alteram a estrutura da

cromatina, pode ser atribuída a diversos fatores. Primeiramente, o nível de repressão ou de indução do acúmulo de transcritos pode ser compensado por mecanismos traducionais, mantendo o mesmo nível de atividade enzimática de uma condição normal, mesmo com níveis alterados de transcritos gênicos.

Adicionalmente, a diferente susceptibilidade dos genes às drogas utilizadas poderia afetar a relação sinérgica dos produtos gênicos, compensando eventuais efeitos inibitórios; ou seja, alterações nas proporções de transcritos específicos poderiam levar a um mesmo resultado em termos de atividade enzimática final.

A inibição dos níveis de expressão de um gene pode ser compensada pelo aumento da expressão de outro gene que codifica uma atividade similar, uma vez que genes de celulases de fungos geralmente compõem famílias multigênicas.

Além disso, enzimas como desacetilases de histonas e histonas acetiltransferases não agem somente sobre histonas, mas também sobre uma grande variedade de proteínas regulatórias e estruturais que interagem com a cromatina (revisado por Brosch *et al.*, 2008). Dessa maneira, alterações pós-traducionais de uma gama maior de proteínas poderia afetar a expressão dos genes de celulase de modo a levar a uma mesma atividade enzimática para o *pool* de enzimas secretadas.

O perfil eletroforético das proteínas presentes nos sobrenadantes de cultura de *P. echinulatum* cultivado com bagaço de cana-de-açúcar apresentou maior produção/secreção de proteínas em relação aos grupos cultivados com glicose. Os sobrenadantes de cultura com bagaço de cana revelaram quatro bandas proteicas bem definidas. Essas bandas não foram observadas nos cultivos com glicose, sugerindo tratar-se de proteínas responsáveis pela degradação do substrato lignocelulósico presente no meio de cultura. Adicionalmente, as bandas proteicas observadas possuem massa molecular semelhante a celulases já identificadas em espécies de *Penicillium* e outros fungos filamentosos. A banda proteica com menor mobilidade eletroforética (aprox. 100kD), possui massa molecular compatível com β -glicosidases de outras espécies de *Penicillium*, tais como *P. decumbens* e *P. pinophilum* (Chen *et al.*, 2010; Joo *et al.*, 2010) e também com a swolenina de *T. reesei* (Saloheimo *et al.*, 2002). A proteína com massa molecular aproximada de 60-70kD mostra-se compatível com celobiohidrolases expressas pela espécie *P. occitanis* (Limam *et al.*, 1995). As bandas com menor massa molecular são próximas às massas moleculares de endoglicanases das espécies

P. pinophilum e *P. purpurogenum* (Bhat *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2010). Devemos, entretanto, pontuar que essas correlações entre as massas moleculares são especulativas. De modo a se comprovar a identidade das proteínas presentes nos sobrenadantes, experimentos como zimograma e/ou *Western blot* deve ser realizados.

É possível que as mesmas drogas e suas concentrações possam levar a efeitos diferentes caso se empregue diferentes substratos como indutores do sistema celulolítico, como, por exemplo, celulose microcristalina purificada e diversos resíduos agroindustriais, como o engaço de banana, farelo de trigo, palha de arroz, palha e sabugo de milho. Deste modo, nossa hipótese de aumentar a produção/atividade de enzimas de interesse industrial por meio da manipulação epigenética de *P. echinulatum* não deve ser descartada em razão dos dados obtidos com bagaço de cana. Outro aspecto que deve ser considerado é que diferentes pré-tratamentos, físicos ou químicos, podem levar a efeitos distintos na indução da transcrição por um mesmo substrato.

VI – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho foi observado, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a espécie *P. echinulatum* apresenta suas hifas septadas e com ramificações. Foi observado também que os conídios dessa espécie apresentam formato globoso a subgloboso, de diâmetro entre 3,5 a 5µm. A análise do crescimento desse fungo sobre bagaço de cana revelou a capacidade desse microrganismo de causar ruptura parcial do substrato, sendo observado o aspecto quebradiço e esfarelado das fibras.

Observou-se, após 48h de cultivo, o pico de expressão dos genes de *egl*, *cbh* e *swo*, sendo detectados acúmulos de transcritos até 20.000 vezes superiores em relação ao cultivo com glicose. O acúmulo de transcritos do gene *bgl* foi pouco alterado. Vinte e quatro horas após o pico de acúmulo desses transcritos foi observado, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, células fúngicas com retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e numerosos grânulos de secreção, características ultraestruturais de células produtoras/secretoras de proteínas.

Demonstrou-se ainda a redução do acúmulo de transcritos dos genes *egl* e *swo* na presença de inibidores de histonas desacetilases: Tricostatina A ($[]_{\text{final}} = 0,25\mu\text{M}$) e butirato de sódio ($[]_{\text{final}} = 1\text{mM}$) em comparação com o grupo controle (ausência de droga). Para o gene *cbh*, foi observada redução somente com butirato de sódio (NaBut). A Tricostatina A (TSA), na menor concentração utilizada (25nM), foi ainda responsável pela redução do acúmulo de transcritos dos genes *egl* e *swo*. Por outro lado, a menor concentração de NaBut utilizada (10µM) não causou efeito sobre o acúmulo de transcritos das celulases de *P. echinulatum*. O acúmulo de transcritos do gene *bgl* não sofreu alteração na presença dos moduladores da estrutura da cromatina. O inibidor de DNA-metiltransferases 5-aza-2'-deoxicidina não provocou alteração no acúmulo de transcritos dos genes de celulase de *P. echinulatum*.

Apesar dos moduladores epigenéticos terem alterado a transcrição de genes de celulases em *P. echinulatum*, essas substâncias não causaram alteração no perfil de proteínas secretadas e nem da atividade de celulases e xilanases dos sobrenadantes de cultura.

As próximas etapas a serem executadas no desenvolvimento desse trabalho são:

- Quantificação do acúmulo de transcritos de genes constitutivos e de proteínas estruturais, a fim de verificar se a ação dos moduladores epigenéticos foi específica para os membros do complexo celulolítico, ou se representa um mecanismo geral;
- Análise do perfil de metilação de sequências promotoras de genes de celulase/xilanase de *P. echinulatum* pela metodologia de tratamento com bissulfito e sequenciamento de DNA;
- Mapeamento nucleossomal das regiões promotoras dos genes de celulase/xilanase de *P. echinulatum*, crescido em condições de repressão/indução e na presença de agentes moduladores da cromatina;
- Avaliar o acúmulo de transcritos dos genes *egl*, *cbh*, *bgl* e *swo* de *P. echinulatum* cultivado em outras fontes lignocelulósicas;
- Análise da atividade enzimática das proteínas fracionadas por eletroforese por meio de zimograma.

**VII – PRODUÇÃO CIENTÍFICA
ASSOCIADA A ESSA DISSERTAÇÃO**

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESSA DISSERTAÇÃO

- Capítulos de livros aceitos para publicação:
 - The cellulolytic system of thermophilic fungi and actinomycetes: structure, regulation and biotechnological applications (Marcio José Poças Fonseca, Robson Willian de Melo Matos e Thiago Machado Mello-de-Sousa) – Livro *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology* (T. Satyanarayana, Jennifer Littlechild e Kawarabayasi Yutaka) -2012;

ABSTRACT: Thermophilic fungi and actinomycetes have been extensively studied in vegetal biomass bioconversion processes, for the formulation of industrial enzymatic pools and as gene donors for the heterologous expression of thermostable enzymes. The obtainment of second generation biofuels and the application in industries such as the textile one are of particular interest. In this chapter, we review the gene structure, gene regulation, biochemical properties and biotechnological applications of lignocellulolytic enzymes, and other potential industrial hydrolases of fungi and actinomycetes. Besides *Humicola grisea* var. *thermoidea*, the object of study of our group for several years, we focus the following fungi: *Humicola insolens*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida peltata*, *Chaetomium thermophilum*, *Coprinopsis cinerea*, *Ganoderma colossum*, *Malbranchea pulchella* var. *sulphurea*, *Melanocarpus albomyces*, *Mucor pusillus*, *Myceliophthora thermophila*, *Myriococcum thermophilum*, *Penicillium duponti*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Sporotrichum thermophile*, *Stilbella thermophila*, *Talaromyces emersonii*, *Thermoascus aurantiacus*, *Thermomyces lanuginosus* and *Thielavia terrestris*. Amongst the actinomycetes, we explore *Acidotherrmus cellulolyticus*, *Cellulomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Thermobifida fusca* and *Thermomonospora curvata*.

- Filamentous fungi cellobiohydrolase genes in biotechnology (Marcio José Poças Fonseca, Fabiana Brandão Alves Silva, Robson Willian de Melo Matos e Thiago Machado Mello-de-Sousa) – Livro *Applications of microbial genes in enzyme technology* (V.K. Gupta, M. Tuohy, G.D. Sharma e S. Gaur), 2012, Nova Sciences Publishers (EUA).

ABSTRACT: Filamentous fungi cellobiohydrolase genes have been extensively studied aiming the high-level heterologous expression of optimized enzymes which could be employed for vegetal residues conversion in useful products at the industrial level. The

generation of biofuels, and of biostoning or biopolishing agents for the textile industry, are of particular interest. In this chapter, we review the main aspects of fungal cellobiohydrolase genes structure and regulation, as well as the most promising studies on their biotechnological applications.

- Trabalhos apresentados em congressos:
 - The molecular biology of *Penicillium echinulatum* cellulolytic system: gene cloning, heterologous expression and transcription regulation studies (Marcio José Poças Fonseca, Marciano Régis Rubini, Robson Willian de Melo Matos, Aldo José Pereira Dillon e Ildinete Silva Pereira). *International conference on microorganisms in environmental management and biotechnology* – Bhopal, Índia (Julho, 2011);

ABSTRACT: *Penicillium echinulatum* 9A02S1 mutant strain produces and secretes large amounts of enzymes capable of saccharifying cellulose into glucose units. This fungus enzymatic properties over agricultural residues, such as sugar-cane bagasse and wheat straw point it out as a promising agent for bioconversion processes at the industrial level. *P. echinulatum* cellulases have been successfully employed in textiles biostoning and biopolishing pilot studies. Our research group is pioneer in investigating *P. echinulatum* molecular genetics. The first described cDNA sequence, encoding endoglucanase 1 (*egl1*), was isolated and clone in *Pichia pastoris* under the control of the AOX promoter. Recombinant enzyme (rEGL1) – presenting 387 amino acids residues, predicted molecular mass of 41 kDa and isoelectric point of 4.99 – was efficiently secreted and displayed an optimum CMCase activity over a broad pH range (5.0-9.0) and at the temperature of 60°C. rEGL1 retained 84% of its residual activity after 1h of pre-incubation at 70°C. Calcium addition to the enzyme assay led to a 364% increase in enzyme activity. Altogether, these properties are particularly interesting to the textile industry. Recently, we have constructed a *P. echinulatum* subtractive cDNA library from RNA molecules obtained under repressing (glucose) and induction (sugar-cane bagasse) conditions for cellulases production, in order to obtain a cDNA repertoire enriched for glycoside hydrolases-encoding sequences. In a transcriptomic approach, randomly selected cDNA clones have been sequenced. Up to now, 192 distinct clones were sequenced. Approximately 70% of them presented the sequence reading quality which allows similarity analyses (PHRED 20; size nucleotides). 18 ESTs were

gathered into 8 *contigs*. 115 *singlets* were also obtained. Amongst these, we highlight cellobiohydrolase, beta-glucosidase, family 7 endoglucanase, endo-beta-galactase, calmodulin, hydrophobin and MFS multidrug transporter-encoding sequences. At the moment, we are employing a 5'/3'-RACE approach to obtain the full-length cDNA sequences corresponding to the glycoside hydrolases genes. These data are relevant to the understanding of *P. echinulatum* genome structure, since no other scientific group investigate this fungus molecular biology. Furthermore, cDNAs cloning into the *P. pastoris* expression system will generate recombinant enzymes which can be employed at agricultural residues bioconversion into useful products at the industrial level.

- The molecular biology of *Penicillium echinulatum* cellulolytic system: gene cloning, heterologous expression and transcription regulation studies (Marcio José Poças Fonseca, Marciano Régis Rubini, Robson Willian de Melo Matos, Aldo José Pereira Dillon e Ildinete Silva Pereira). *BioMicroWorld 2011 (IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology)* - Málaga, Espanha (Setembro, 2011);

ABSTRACT: idem do item anterior.

- The impact of chromatin-modulating drugs on the expression of *Penicillium echinulatum* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* glycoside hydrolase genes (Marcio José Poças-Fonseca, Thiago Machado Mello-de-Sousa, Robson Willian de Melo Matos, Bárbara Gomes Paes e Marciano Régis Rubini). *International Conference on Industrial Biotechnology (ICIB) – Patiala, Índia* (Novembro, 2012).

ABSTRACT: Since chromatin structural conformation is of pivotal importance for the regulation of several classes of eukaryotic genes, we are interested in investigating the effect of drugs which can alter this conformation on the expression of the *Penicillium echinulatum* 9A02S1 mutant strain and *Humicola grisea* var. *thermoidea* genes whose products are involved in cellulose breakdown. In this view, fungi were grown in minimal medium supplemented with 0.1% sugarcane bagasse (SCB, inducing condition) or 2.0% glucose (GLU, repressing condition), with or without different concentrations of 5-azadeoxycytidine (5-AZA, an inhibitor of DNA methylcytosine transferases), Trichostatin A (TSA) or sodium butyrate (SB), which are histone deacetylase inhibitors.

A very heterogeneous transcriptional response was obtained for *P. echinulatum*. The beta-glucosidase I gene (*bgl1*) expression was not affected by the drugs, no matter which carbon source was employed. Upon growth on SCB, endoglucanase 1 gene (*egl1*) expression was not affected by 5-AZA; nonetheless, a decrease in transcripts accumulation was detected with TSA and SB. When the fungus was grown on glucose, 5-AZA and SB inhibited *egl1* transcription, while 25 nM TSA presented a stimulatory effect. None of the drugs affected cellobiohydrolase 1 gene (*cbh1*) transcription on glucose; considering growth on SCB, 5-AZA presented no effect, but both TSA and NaBu down-regulated gene expression when employed at 0,25 μ M and 1 mM, respectively. Swollenin gene (*swl*) expression was also not affected by any of the drugs when the fungus was grown on glucose, but upon growth on SCB all of them led to a decreased transcription. Interestingly, in spite of affecting gene expression depending on the growth conditions and the drugs concentration, enzymatic assays (PFase, CMCase and total xylanase) did not reveal any alteration in reducing sugars release levels.

Since fungi cellulase genes can compose multigenic families, and there is a paucity of information on *P. echinulatum* genome structure, we believe that the effect of the epigenetic drugs on the expression of this fungus specific genes can be overcome by the products of less susceptible genes.

On the other hand, *H. grisea* var. *thermoidea* cellulase genes transcription in response to the different epigenetic state modulation drugs was extremely regular upon cultivation on SCB, especially concerning DNA methylation. 5-AZA led to an increased transcript accumulation for cellobiohydrolase I.1 (*cbh1.1*), cellobiohydrolase I.2 (*cbh1.2*), endoglucanase I (*egl1*), endoglucanase II (*egl2*), endoglucanase III (*egl3*), beta-glucosidase 4 (*bgl4*) and xylanase I (*xyn1*) genes. Nonetheless, both histone deacetylase inhibitors (TSA and SB) provoked transcript level diminution, except for TSA x *cbh1.2* (increased accumulation). Curiously, *egl4* gene transcription, which we had previously demonstrated that does not obey to the same regulatory mechanism proposed for the other genes, is not affected by any of the drugs. The same phenomenon was verified for the PacC and CreA transcription factors genes expression. At the moment, we are investigating *H. grisea* genes expression upon growth on glucose as the sole carbon source.

Our data indicate that the epigenetic approach can be employed for the production optimization of fungi enzymes of industrial relevance.



Dr. T. Satyanarayana
Professor

Department of Microbiology
UNIVERSITY OF DELHI SOUTH CAMPUS
BENITO JUAREZ ROAD, NEW DELHI -110021, (INDIA)

Phone: 91-11-24112008 (D)

Fax: 91-11-24115270

email: tsnarayana@gmail.com, tsnarayana@vsnl.net

Prof. Marcio José Poças-Fonseca
Department of Genetics and Morphology. Institute of Biological Sciences
Darcy Ribeiro University Campus
Brasilia-DF, 70.910-900. Brazil

March 8, 2012

Dear Prof. Marcio José Poças-Fonseca,

Your chapter entitled '**The cellulolytic system of thermophilic fungi and actinomycetes: structure, regulation, and biotechnological applications**' submitted by you and your students (Robson Willian de Melo Matos and Thiago Machado Mello-de-Sousa) has been accepted for publication in the book '**Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology**'. This book will be published by December 2012 or early 2013.

With best regards,

Sincerely,

(T. Satyanarayana)

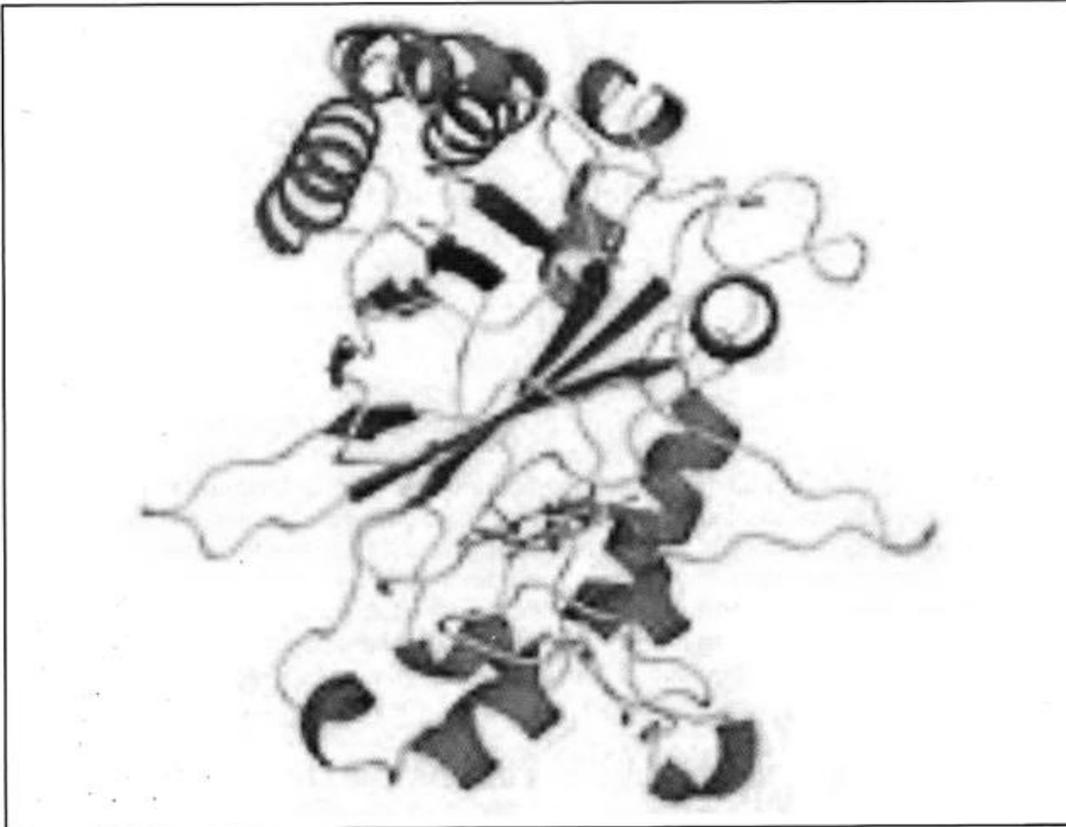


INTERNATIONAL CONFERENCE ON



MICROORGANISMS IN

MICROBIAL ENZYMES IN BIOTECHNOLOGY



Curtsey : Google images

Chairperson : Dr. Kawarabayashi Yukata

Co-chairperson : Dr. S.K. Khare

Rapporteur : Mrs. Nidhi Gujar

SPEAKERS

- ▶ **Dr. M.V. Deshpande**
- ▶ **Dr. T.C. Bhalla**
- ▶ **Dr. S. Dayanandan**
- ▶ **Dr. Marcio Pocas**

✦

and extent of cyanide and nitrile contamination of soil, water and air and the potential application of nitrile or cyanide metabolizing organisms in the bioremediation of contaminated habitats will be discussed.

Evolution, organization and horizontal transfer of organophosphate degrading (*opd*) genes among soil bacteria



led to a 364% increase in enzyme activity. Altogether, these properties are particularly interesting to the textile industry.

Recently, we have constructed a *P. echinulatum* subtractive cDNA library from RNA molecules obtained under repressing (glucose) and induction (sugar-cane bagasse) conditions for cellulases production, in order to obtain a cDNA repertoire enriched for glycoside hydrolases-encoding sequ



SPONSORS :

- ❖ **Biodiversity Project, UNDP, M.P. State Biodiversity Board, Bhopal**
 - ❖ **Council of Scientific and Industrial Research (CSIR)**
- 



**VIII– REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Sater, M. A. & El Said, A. H. M.** (2001). Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47(1):15–21.
- Alcocer, M. J. C. et al.** (2003). Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(6):726–732.
- Alvira, P. et al.** (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101:4851-4861.
- Anderson, H. E. et al.** (2009). The fission yeast HIRA histone chaperone is required for promoter silencing and the suppression of cryptic antisense transcripts. *Molecular and Cellular Biology* 29(18): 5158-5167.
- Arantes, V. & Saddler, J. N.** (2011). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels* 4:3.
- Arantes, V. & Saddler, J. N.** (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3(1): 4.
- Aro, N., Pakula, T. & Penttillä, M.** (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29(4):719-739.
- Bae, H.-J., Kim, H. J. & Kim, Y. S.** (2008). Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology* 99(9): 3513-3519.
- Bakri, Y., Jacques, P. & Thonart, P.** (2003). Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105:737–748.
- Barkai-Golan, R.** (2008). Chapter 7 - *Penicillium* Mycotoxins. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. B.-G. Rivka & P. Nachman. San Diego, Academic Press: 153-183.

- Barra, J. L. et al.** (2000). Histone H1 is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascobolus immersus* and essential for long life span. *Molecular and Cellular Biology* 20(1): 61-69.
- Beg, Q. K. et al.** (2000). Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 27(7): 459-466.
- Béguin, P. & Aubert, J.-P.** (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13(1): 25-58.
- Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L.** (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *PNAS USA* 97:13708–13713.
- Bhat, M. K., McCrae, S. I. & Wood, T. M.** (1989). The endo-(1 → 4)- β -D-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification, and characterization of five major endoglucanase components. *Carbohydrate Research* 190:279–297.
- BNDES.** (2008). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. 1ª edição. *BNDES*.
- Boisset, C. et al.** (1997). An ultrastructural study of the interaction of a fungal endoglucanase from *Humicola insolens* with cotton fibres. *Cellulose* 4:7–20.
- Bradner, J. R. et al.** (1999). Hemicellulase activity of antarctic microfungi. *Journal of Applied Microbiology* 87(3):366–370.
- Brito, F. F. et al.** (2003). *Penicillium nalgiovense* as an occupational and contact allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112(1): 213-215.
- Brosch, G., Loidl, P. & Graessle, S.** (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 32(3):409-39.
- Brotman, Y. et al.** (2008). Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiology* 147(2): 779-789.
- Brown, J. A., Collin, S. A. & Wood, T. M.** (1987b). Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*, mutant strain NTGIII/6. *Enzyme and Microbial Technology* 9(3):176–180.

- Brown, J. A., Falconer, D. J. & Wood, T.M.** (1987a). Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulose and α -glucosidase production. *Enzyme and Microbial Technology* 9(3):169–175.
- Burgers, W. A., Fuks, F. & Kouzarides, T.** (2002). DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends in Genetics* 18(6):275–277.
- Camassola, M. & Dillon, A.** (2010). Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(7): 1889-1900.
- Camassola, M. & Dillon, A. J. P.** (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 103:2196–2204.
- Candido, E. P., Reeves, R. & Davie, J. R.** (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14(1):105–113.
- Carducci, M. A. et al.** (2001). A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule. *Clinical Cancer Research* 7(10):3047–55.
- Carmen, A. A. et al.** (1999). Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *PNAS* 96(22): 12356-12361.
- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3:1–30.
- Catalanotto, C. et al.** (2004). Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 24(6): 2536-2545.
- Chávez, R. et al.** (2002). Differences in expression of two endoxylanase genes (*xynA* and *xynB*) from *Penicillium purpurogenum*. *Gene* 293:161–168.
- Chávez, R. et al.** (2004). The acetyl xylan esterase II gene from *Penicillium purpurogenum* is differentially expressed in several carbon sources, and tightly regulated by pH. *Biological Research* 37(1):107–113.

- Chávez, R., Bull, P. & Eyzaguirre, J.** (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology* 123(4): 413-433.
- Chen X-ai, et al.** (2010a). Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. *Applied and Environmental Microbiology* 76(8):2556–2561.
- Chen, M. et al.** (2010). Isolation and characterization of a α -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology* 46(6): 444-449.
- Choy, J. S. et al.** (2001). Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. *The Journal of Biological Chemistry* 276(47): 43653-43662.
- Christman, J. K. et al.** (1983). Effect of 5-Azacytidine on Differentiation and DNA Methylation in Human Promyelocyte Leukemia Cells (HL-60). *Cancer Research* 43:763-769.
- Cosgrove, D. J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 6(11): 850-861.
- Creusot, F., Acs, G. & Christman, J. K.** (1982). Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *The Journal of Biological Chemistry* 257:2041-2048.
- Csiszár, E., Urbánszki, K. & Szakács, G.** (2001). Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:1065-1072.
- Cummings, J. H. et al.** (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28(10):1221–1227.
- Dashtban, M., Schraft, H. & Qin, W.** (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities and Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 5(6): 578-595.
- De Carli, L. & Larizza, L.** (1988). Griseofulvin. *Mutation Research* 195(2):91-126.
- de Castro, A. M. et al.** (2010). Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37(2): 151-158.

- Dervilly, G. et al.** (2002). Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate Polymers* 47(2):143–149.
- Dillon, A. J. P. et al.** (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Applied Microbial and Cell Physiology* 70:740–746.
- Dillon, A. J. P., Paesi-Toresan, S. O. & Barp, L. P.** (1992). Isolation of cellulase-producing mutants from *Penicillium sp.* strains denominated 3MUV3424. *Revista Brasileira de Genética*, 15(3):491–498.
- Duong, T. A.** (1996). Infection due to *Penicillium mameffeii*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clinical Infection Diseases* 23:125-130.
- Egaña, L. et al.** (1996). Purification and characterization of two acetyl-xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 24, 33–39.
- Endo A., Kuroda M. & Tsujita, M.** (1976). ML-236A, ML236B, and ML236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *The Journal of Antibiotics* 29:1346-1348.
- Esteller, M.** (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427–5440.
- Fachin, V. L., Meneghetti, L. R. & Dillon, A. J. P.** (1995). Isolamento de mutantes para a produção de celulasas na linhagem 3427 de *Penicillium sp.* *Brazilian Journal of Genetics* 18:230.
- Fassatiová, O.** (1977). A Taxonomic study of *Penicillium* series Expansa Thorn emend. Fassatiová. *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 12:283-335.
- Filho, E. X. F., Puls, J. & Coughlan, M. P.** (1993). Biochemical characteristics of two endo- β -xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology* 11:171–180.
- Finnin, M. S. et al.** (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401:188–193.

- Fisch, K. M. et al.** (2009). Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36(9): 1199-1213.
- Fleming, A.** (1929). On the antibacterial action of cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* 10, 226–236.
- Freedman, T. & Pukkila, P. J.** (1993). De novo methylation of repeated sequences in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 135(2): 357-366.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O.** (1983). Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 46:1301–1310.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O.** (1989). Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and Mycotoxin Production. *Mycologia* 81(6): 837-861.
- Frisvad, J. C., & Samson, R.** (2004). Polyphasic Taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49:1-173.
- Gabbara, S. & Bhagwat, A. S.** (1995). The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5-)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor. *Biochemical Journal* 307:87–92.
- Galbe, M. & Zacchi, G.** (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology Biotechnology* 59:618-628.
- Garcia I, et al.** (2004). Chromatin rearrangements in the prnD-prnB bidirectional promoter: dependence on transcription factors. *Eukariotic Cell* 3:144–156.
- Gaspar, A. et al.** (1997). Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10-c. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 67:45–58.
- Ghose, T. K.** (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry* 59(2):257-268.

- Gilbert, J. et al.** (2001). A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. *Clinical Cancer Research* 7(8):2292–2300.
- Glaser, K. B.** (2007). HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential. *Biochemical Pharmacology* 74(5): 659-671.
- Gregory, P. D., Wagner, K. & Hörz, W.** (2001). Histone Acetylation and Chromatin Remodeling. *Experimental Cell Research* 265(2): 195-202.
- Grewal, S. I. S., Bonaduce, M. J. & Klar, A. J. S.** (1998). Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast. *Genetics* 150(2): 563-76.
- Grunstein, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389(6649):349–352.
- Guglielminetti, M. et al.** (2001). Respiratory syndrome very similar to extrinsic allergic alveolitis due to *Penicillium verrucosum* in workers in a cheese factory. *Mycopathologia* 149(3): 123-129.
- Haas, H. et al.** (1992). Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1117(3):279–286.
- Hansen, K. R., Ibarra, P. T. & Thon, G.** (2006). Evolutionary-conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. *Nucleic Acids Research* 34(1): 78-88.
- Henrikson, J. C. et al.** (2009). A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7(3): 435-438.
- Hoffert, M.I. et al.** (2002). Advanced Technology Paths to Global Climate Stability: Energy for a Greenhouse Planet. *Science* 298 (5595), 981-987.
- Holliday, R.** (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1(2):76-80.
- Holtzapple, M. et al.** (1990). **Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents.** *Biotechnology and Bioengineering* 36(3):275-287.

- Hsu, T. A., Ladisch, M. R. & Tsao, G. T.** (1980). Alcohol from cellulose. *Chemical Technology* 10 (5):315–319.
- Ilmén, M. et al.** (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4):1298–1306.
- Izawa, M. et al.** (2009). Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 55(6): 489-498.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb.** (2002). The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 981(1):82-96.
- Jäger, G. et al.** (2011). How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels* 4(1): 33.
- Joglekar, A. V. & Karanth, N. G.** (1984). Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium fuculosum* UV-49. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 1079–1084.
- Jones, P. A. & Taylor, S. M.** (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20:85–93.
- Joo, A.-R. et al.** (2010). Production and characterization of α -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry* 45(6):851-858.
- Judelson, H. S. & Tani, S.** (2007). Transgene-induced silencing of the zoosporogenesis-specific NIFC gene cluster of *Phytophthora infestans* involves chromatin alterations. *Eukaryotic Cell* 6(7): 1200-1209.
- Kadotani, N. et al.** (2004). One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. *The Journal of Biological Chemistry* 279(43): 44467-44474.
- Kim, H. J., Leeds, P. & Chuang, D-M.** (2009b). The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *Journal of Neurochemistry* 110(4): 1226-1240.
- Kim, J. K., Samaranayake, M. & Pradhan, S.** (2009a). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(4):596-612.

- Kim, S. & Dale, B.** (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* 26:361–375.
- Klemm, D. et al.** (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* 44(22): 3358-3393.
- Knauf, M.; Moniruzzaman, M.** (2004). Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal* 106(1263):147-150.
- Krogh, K. B. R. et al.** (2004). Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 114:389–401.
- Kroon, P.A. et al.** (2000). A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate-binding module. *European Journal of Biochemistry* 267(23):6740–6752.
- Kumar, K. S. et al.** (2009). Production of α -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5): 494-498.
- Kumar, R. & Wyman, C.E.** (2009). Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? *Bioresource Technology* 100:4193-4202.
- Lawrence, R. J. & Volpe, T. A.** (2009). Msc1 links dynamic Swi6/HP1 binding to cell fate determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(4): 1163-1168.
- Lee, D. W. et al.** (2008). A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 3(6): e2531.
- Lee, J., Kwon, K-S. & Hah, Y. C.** (1996). Regulation of α -glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* 135(1): 79-84.
- Lee, K.-M. et al.** (2010). Purification and characterization of a thermostable endo- α -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology* 46(3–4): 206-211.
- Leitão, A. L.** (2009). Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6(4):1393-1417.

- Lenfant, F. et al.** (1996). All four core histone N-termini contain sequences required for the repression of basal transcription in yeast. *The EMBO Journal* 15(15):3974–3985.
- Li, L. H. et al.** (1970). Cytotoxicity and Mode of Action of 5-Azacytidine on L1210 Leukemia. *Cancer Research* 30:2760-2769.
- Licorish, K. et al.** (1985). Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 76:819–825.
- Limam, F. et al.** (1995). Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. *Enzyme and Microbial Technology* 17(4): 340-346.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Lodish, H. et al.** (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Lovins, A.B. et al.** (2004). *Winning the Oil Endgame: Innovation for Profits, Jobs, and Security*. Rocky Mountain Institute, Snowmass, Colorado (EUA).
- Mai, A. & Altucci, L.** (2009). Epi-drugs to fight cancer: From chemistry to cancer treatment, the road ahead. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(1): 199-213.
- Makovets, S., Williams, T. L. & Blackburn, E. H.** (2008). The telotype defines the telomere state in *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited as a dominant non-Mendelian characteristic in cells lacking telomerase. *Genetics* 178(1): 245-57.
- Maloisel, L. & Rossignol, J. L.** (1998). Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. *Genes & Development* 12(9): 1381-1389.
- Mandelli, J. et al.** (1995). Produtos de fusão entre *Trichoderma* sp. e *Pencillium* sp. para a produção de celulasas. *Brazilian Journal of Genetics* 18:231.
- Mandels, M. & Sternberg, D.** (1976). Recent advances in cellulase technology. *Journal of Fermentation Technology* 54:267–286.
- Margolles-Clark, Ilmén, E. & Penttilä, M.** (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* 57(1–3):167-179.

- Mariadason, J. M., Corner, G. A. & Augenlicht, L. H.** (2000). Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Research* 60:4561–72.
- Martins, L. F. et al.** (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology* 99:1417–1424.
- Mazor, Y. & Kupiec, M.** (2009). Developmentally regulated MAPK pathways modulate heterochromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 37(14): 4839-49.
- Medeiros, R. G., Hanada, R. & Filho, E. X. F.** (2003). Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52(2):97–100.
- Mernitz, G. et al.** (1996). Endoglucanase II (EGII) of *Penicillium janthinellum*: cDNA sequence, heterologous expression and promoter analysis. *Current Genetics* 29(5):490-495.
- Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428.
- Mishra, C., Seeta, R. & Rao, M.** (1985). Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme and Microbial. Technology* 7(6):295–299.
- Mosier, N. et al.** (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96 (6):673–686.
- Neves-Costa, A. et al.** (2009). The SNF2-family member Fun30 promotes gene silencing in heterochromatic loci. *PLoS One* 4(12): e8111.
- Nolan, T. et al.** (2005). The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research* 33(5): 1564-1573.
- Park, S. et al.** (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* 3:10.

- Patel, B. K., Gavin-Smyth, J. & Liebman, S. W.** (2009). The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biology* 11(3): 344-349.
- Paterson, R. R. M., Venâncio, A. & Lima, N.** (2006). A practical approach for identifications based on mycotoxin characters of *Penicillium*. *Revista Iberoamericana de Micología* 23(3): 155-159.
- Piskala, A. & Sorm, F.** (1964). *Collection of Czech Chemical Communication* 29:2060-2070.
- Pitt, J.I.** (1988). A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. 2nd Edition. North Ryde, NSW: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Polizeli, M. L. T. M. et al.** (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5):577–591.
- Prade, R.A.** (1995). Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:103–131.
- Ragauskas, A. J., Poll, K. N. & Cesternino, A. J.** (1994). Effects of xylanase pretreatment procedures on non chlorine bleaching. *Enzyme and Microbial Technology* 16(6):492–495.
- Ragauskas, A.J. et al.** (2006) The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 311:484–489.
- Raper, K. B. & Thom, C.** (1949). A manual of *Penicillia*. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Rau, M. et al.** (2008). Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres. *Biocatalysis and Biotransformation* 26(5):383-390.
- Reese, E. T. A., Maguire, A. & Parrish, F. W.** (1973). Production of β -D-xylopyranosidase by fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 19(9):1065–1074.
- Ren, P. et al.** (2001). The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* 56(5):419–424.
- Reyes-Dominguez, Y. et al.** (2008). Nucleosome positioning and histone H3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans* prnD-prnB bidirectional promoter. *Eukaryotic Cell* 7(4): 656-663.

- Riesen, M. & Morgan, A.** (2009). Calorie restriction reduces rDNA recombination independently of rDNA silencing. *Aging Cell* 8(6): 624-632.
- Rountree, M. R. & Selker, E. U.** (2010). DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*. *Heredity* 105:38–44.
- Royer, J.C. et al.** (2004). *Penicillium* Genomics. *Applied Mycology and Biotechnology* (4):285-293.
- Rubini, M. R. et al.** (2010). Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. *Journal of Applied Microbiology* 108(4): 1187-1198.
- Rubini, M.R.** (2009). Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*. Tese de doutorado. Universidade de Brasília.
- Ryu, D. D. Y. & Mandels, M.** (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 2(2): 91-102.
- Saddler, J. N., Hogan, C. M. & Louis-seize, G.** (1985). A comparison between the cellulases system of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22(2):139–145.
- Saddler, J. N. & Gregg, D. J.** (1998). Ethanol production from forest product wastes. In: Bruce A, Palfreyman J.W. (eds) *Forest products biotechnology*. Taylor & Francis, London, p. 183–207.
- Saha, B. C.** (2000). α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18(5):403–423.
- Saloheimo, M. et al.** (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269(17): 4202-4211.
- Sampedro, J. & Cosgrove, D.** (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology* 6(12):242.
- Samson, R. A., Stolk, A. C. & Hadlock, R.** (1976). Revision of the subsection Fasciculata of *Penicillium* and some allied species. *Studies in Mycology* 11:1-47.

- Sandgren, M., Stahlberg, J. & Mitchinson, C.** (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 3:246–291.
- Santi, D. V., Garrett, C. E. & Barr, P. J.** (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* 33:9-10.
- Sehnem, N. et al.** (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbial and Cell Physiology* 72(1):163-167.
- Serebryanyi, V. A. et al.** (2002). Cloning of *Penicillium canescens* endo-1,4- β -xylanase gene and construction of multicopy strains. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 420–426.
- Shen, T. & Gnanakaran, S.** (2009). The Stability of Cellulose: A Statistical Perspective from a Coarse-Grained Model of Hydrogen-Bond Networks. *Biophysical journal* 96(8): 3032-3040.
- Shwab, E. K. et al.** (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* 6(9):1656–1664.
- Singh, P. et al.** (2008). Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60(6):368-375.
- Steiner, J., Socha, C. & Eyzaguirre, J.** (1994). Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(3):280–284.
- Sun, J.X. et al.** (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation Stability* 84:331–339.
- Sun, X. et al.** (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 42(7): 560-567.
- Sunna, A. & Antranikian, G.** (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 17(1):39–67.
- Svendsen, A. & Frisvad, J. C.** (1994). A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycological Research* 98(11):1317-1328.

- Tengborg, C., Galbe, M. & Zacchi, G.** (2001). Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnology Progress* 17:110–117.
- Terao, Y. et al.** (2001). Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *International Journal of Cancer* 94(2):257–267.
- Thygesen, A. et al.** (2003). Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology* 32(5):606–615.
- Tsuji, N. et al.** (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo) 29(1):1–6.
- Twomey, L. N. et al.** (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 108:71–82.
- Van camp, W.** (2005). Yield enhancement gene: seeds for growth. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 147-153.
- van Peij, N. N. M. E., Visser, J. & de Graaff, L. H.** (1998). Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology* 27(1):131–142.
- van West, P. et al.** (2008). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans* is established through chromatin remodelling. *Microbiology* 154:1482-1490.
- van Wyk, J. P. H.** (1999). Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass and Bioenergy* 16(3): 239-242.
- Vasconcelos, A. & Cavaco-Paulo, A.** (2006). Enzymatic removal of cellulose from cotton/polyester fabric blends. *Cellulose* 13:611–618.
- Velho, T. A. F.** (2000). Transformação do fungo *Penicillium echinulatum* : Expressão Heteróloga do gene da β -glicosidase I de *Trichoderma reesei*. Dissertação de Mestrado Universidade de Caxias do Sul.

- Vossler, J. L.** (2001). *Penicillium marneffeii*: an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter* 23: 25-29.
- Wang, M. et al.** (2010). High-Level Expression and Efficient Purification of Bioactive Swollenin in *Aspergillus oryzae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(7):2027-2036.
- Wei, X. et al.** (2011). Transcription analysis of lignocellulolytic enzymes of *Penicillium decumbens* 114-2 and its catabolite-repression-resistant mutant. *Comptes Rendus Biologies* 334(11):806-811.
- Williams, R. B. et al.** (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6(11):1895-1897.
- Wilson, D. B.** (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 20(3):295-299.
- Wood, T. M.** (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochemical Society Transactions* 13, 407–410.
- Wyman, C.E.** (2003). Potential Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, and Power. *Biotechnology Progress* 19:254–262.
- Yao, Q. et al.** (2008). Gene Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase, Swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(11): 2799-2805.
- Yoshida, M. et al.** (1990). Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in Friend leukemia cells. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo) 43(9):1101–1106.
- Youngchim, S., Hay, R. J. & Hamilton, A. J.** (2005). Melanization of *Penicillium marneffeii* in vitro and in vivo. *Microbiology* 151(1): 291-299.
- Zadra, I. et al.** (2000). xylP promoter-based expression system and its use for antisense downregulation of the *Penicillium chrysogenum* nitrogen regulator NRE. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11):4810–4816.
- Zeilinger, S. et al.** (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. *Molecular Genetics and Genomics* 270(1):46–55.