

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fosfolipase C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em *Aspergillus nidulans*

Janice Aparecida Rafael Arakawa

Ribeirão Preto

2009

RESUMO

RAFAEL, J.A. **Fosfolipase C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em *Aspergillus nidulans***. 2009. 68 f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os conhecimentos sobre os mecanismos regulatórios responsáveis pelo crescimento dos fungos filamentosos apresentam lacunas e sua compreensão é necessária para o desenvolvimento de uma terapêutica antifúngica mais adequada, assim como para incrementar a síntese de produtos de interesse comercial. Assim sendo, estudar o envolvimento do Ca^{2+} na resposta de um fungo modelo como *A. nidulans* sob fontes de carbono diferentes constitui um meio de gerar conhecimentos sobre as características de crescimento dos fungos filamentosos, de sua resposta a adaptação ambiental e dos mecanismos que controlam essa resposta. Analisou-se na linhagem A26 e na AP27, esta última com ruptura do gene da *plcA*, o gradiente de Ca^{2+} citosólico, a morfologia das hifas, a germinação e o ciclo de divisão nuclear quando as linhagens tinham calcineurina ou calmodulina inibidas e quando os canais de Ca^{2+} estavam bloqueados ou abertos. Os níveis de Ca^{2+} citosólico na linhagem A26, crescendo em presença de glicose, foram maiores que os detectados em meio suplementado com pectina. O ciclo de germinação e divisão celular no AP27, independentemente da fonte de carbono, mostrou-se mais lento se comparado com a linhagem A26, provavelmente devido ao fato de seus estoques intracelulares de Ca^{2+} , tanto em nível vesicular quanto citosólico, serem menores. A linhagem AP27 apresentou ramificações dicotômicas nas pontas das hifas e nas hifas laterais em ambas as fontes de carbono nas quais foi cultivada, o que não se observou na linhagem A26. Quando calcineurina foi inibida por ciclosporina A, as hifas das duas linhagens, em ambas condições de cultivo, alongaram-se menos e apresentaram-se mais ramificadas, no entanto este efeito foi mais pronunciado em presença de glicose, e entre as duas linhagens pode-se dizer que foi mais intenso na linhagem AP27, demonstrando a importância dos níveis de cálcio na atividade desta enzima e conseqüentemente no desenvolvimento normal das hifas. A abertura dos canais de Ca^{2+} , por ionóforo, produziu hiperramificação em ambas as linhagens, mas principalmente quando cresciam em pectina e ao contrário do efeito observado em presença de verapamil, que bloqueia os canais de Ca^{2+} , não promoveram hifas laterais e nem pontas dicotômicas. No entanto o outro bloqueador dos canais de Ca^{2+} testado, ácido caurenóico, apresentou efeito morfológico diferente, pois as hifas tornaram-se curvas o que indica perda de polaridade. O inibidor da calmodulina (TFP) retardou a germinação, principalmente no mutante AP27, quando crescendo em presença de glicose. Lembrando que o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ativa a calcineurina e que o mutante apresenta menores níveis de cálcio, esse resultado é justificável. A ruptura do gene *plcA* não impediu o crescimento e desenvolvimento do mutante, provavelmente porque a função desta enzima poder ser provida por outras partes do genoma, mas comprometeu os níveis intracelulares de cálcio e conseqüentemente a sua morfologia. Este estudo mostra a importância da fosfolipase C, para manutenção dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , no desenvolvimento normal das hifas de *A. nidulans* e, pela primeira vez, demonstra que esses níveis são diferentes quando o fungo cresce em

presença de uma fonte de carbono, prontamente metabolizável ou não. Esses resultados conferem ao cálcio um papel modulador nessas condições de cultivo.
Palavras-chave: *Aspergillus nidulans*, Fosfolipase C, íons Ca^{2+}

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sinalização celular

Organismos multicelulares podem ser considerados sociedades celulares extremamente complexas, nas quais cada indivíduo (célula) possui funções específicas e dinâmicas, objetivando o bem do organismo e não o de cada célula (HARDMAN; LIMBRID, 2005). Sua sobrevivência depende de uma elaborada rede de comunicação intercelular que coordena o crescimento, a diferenciação e o metabolismo de diferentes tecidos e órgãos. Células em pequenos grupos, na maioria das vezes, comunicam-se pelo contato direto. Através de comunicações especializadas nas membranas citoplasmáticas de células adjacentes, ocorrem trocas de pequenas moléculas e coordenação de respostas metabólicas. A resposta celular para uma determinada molécula sinalizadora extracelular depende de sua ligação com um receptor de proteína específico, localizado na superfície de uma célula-alvo ou em seu núcleo ou no citosol. O acoplamento de ligantes a muitos receptores celulares de superfície leva ao aumento ou ao decréscimo na concentração de moléculas sinalizadoras intracelulares de vida curta, referidas como mensageiros secundários. Essas moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular incluem: 3',5'-AMP cíclico (AMPc); 3',5'-GMP cíclico (GMPc); 1,2-diacilglicerol (DAG); inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃); vários fosfolípidos de inositol (fosfoinosítídeos); e Ca²⁺ (LODISH et al., 2000). Uma superfamília numerosa de receptores, responsáveis por muitos alvos farmacológicos, interage com proteínas heterotriméricas reguladoras da ligação do GTP (guanosina trifosfato), conhecidas como proteínas G, as quais são transdutores de sinais, propagando a informação do receptor para uma ou mais proteínas efetoras. Os efetores regulados pela proteína G são enzimas como a adenilciclase, fosfolipase C, fosfodiesterases e canais iônicos da membrana plasmática seletivos ao Ca²⁺ e ao K⁺ (HARDMAN; LIMBRID, 2005).

A ativação da proteína G específica, ativa a fosfolipase C (PLC), uma enzima ligada à membrana, que hidrolisa um fosfolípido da membrana (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) PIP₂ para gerar dois mensageiros secundários; inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e o lipídeo diacilglicerol (DAG). Ambos são mensageiros secundários de suprema importância no controle de muitas funções celulares. A descoberta do papel dos mensageiros secundários IP₃ e DAG trouxe o conhecimento da sinalização pelos fosfoinosítídeos (COCCO et al., 2006). Enquanto DAG ativa uma família de fosfolípidos dependente de proteína quinase. O IP₃ liga-se aos receptores dos canais de

liberação de Ca^{2+} sensíveis ao IP_3 presente no retículo endoplasmático, promovendo a liberação do Ca^{2+} e aumentando rapidamente sua concentração interna (Figura 1, pág. 3). O Ca^{2+} , por sua vez, pode ligar-se e regular diretamente os canais iônicos, ou pode ligar-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} /calmodulina o qual ativa a família dos fosfolipídeos dependentes de proteína quinase (HARDMAN; LIMBRID, 2005). DAG-PKC ou IP_3 - Ca^{2+} tornaram-se um dos elementos transdutores de sinais mais importantes por estarem envolvidos com múltiplas respostas celulares (JIN-CHUAN; et al., 2003). As fosfolipases C são consideradas importantes reguladores nos processos celulares (KUNZE et al., 2005). Cinco genes de PLCs fosfoinositídeo – específica foram identificados em três espécies de fungos filamentosos: uma seqüência de *Botryotinia fuckeliana*, uma de *Aspergillus nidulans*, e três de *Neurospora crassa* (JUNG et al., 1997). Em eucariotos superiores, fosfolipases C (PI-PLCs) fosfatidilinositol-específicas são importantes na patogênese do câncer, na regulação da ação de inúmeros fatores do crescimento e oncogênese envolvida na proliferação de células. Seis isotipos de PI-PLC (β , γ , δ , ζ , ϵ e η) e no mínimo 13 isoformas foram descritas.

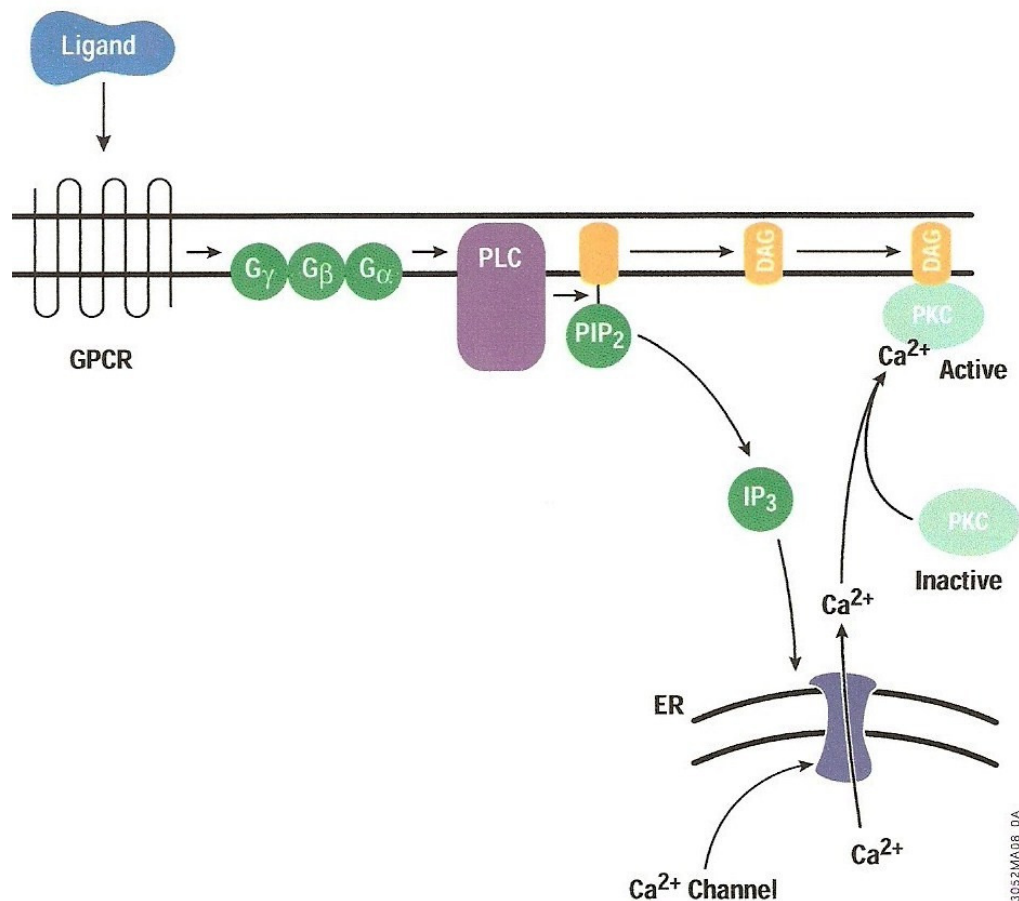


Figura 1. Representação esquemática da ativação da fosfolipase C. Estímulo externo ativa a proteína G acoplado a receptores (GPCR), que ativa uma proteína G estimulante. A proteína G ativa fosfolipase C (PLC), que cliva fosfoinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em 1,2,-diacilglicerol e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). O IP₃ interage com canal de cálcio no retículo endoplasmático, liberando Ca²⁺ no citoplasma. O aumento dos níveis de Ca²⁺ ativa PKC, que transloca-se para a membrana ancorando-se ao DAG. (Fonte: Guide Signal Transduction Resource)

É sabido que IP₃ induz a liberação de Ca²⁺ e por isso é sugerido que esteja envolvido no alongamento das hifas. Brunton e Gadd (1991) demonstraram que vários componentes do ciclo do IP₃ são importantes no dimorfismo da hifa em espécies de *Ophiostoma*. Em *Candida albicans*, há um aumento nos níveis de IP₃ durante a formação do tubo germinativo (SILVERMAN-GAVRILA; LEW, 2002). Não está totalmente claro se esses efeitos estão ligados diretamente a liberação de Ca²⁺ e ao crescimento apical. A liberação de Ca²⁺, das vesículas mediada por IP₃, é proporcional ao número de vesículas presentes nas pontas das hifas, assim, um pequeno número de vesículas nas pontas resulta em menor quantidade de Ca²⁺ liberada (VIRAG; GRIFFITHS, 2004). Portanto, a inibição da atividade de fosfolipase C prejudicará a rota

de transdução de sinal dependente de IP_3 , devido à depleção do inositol celular que resulta, por sua vez, em diminuição nos níveis de Ca^{2+} citosólico (CHUNG, 2003).

Estudos farmacológicos indicam que a sinalização de Ca^{2+} regula numerosos processos em fungos filamentosos. Entretanto a identificação do componente principal em fungos filamentosos ainda é desconhecida (GALAGAN et al., 2003). Confirmação de detalhes do envolvimento de Ca^{2+} na transdução de sinais em fungo não tem avançado tanto como em mamíferos, em parte devido a dificuldades em quantificar Ca^{2+} citosólico livre ($[Ca^{2+}]_c$) (GADD; FOSTER, 1997).

De leveduras a humanos, a proteína quinase C (PKC) é uma enzima de importância central no processo de transdução de sinal. Como a maioria das proteínas sinalizadoras, possui uma grande família com múltiplas isoformas exibindo características individuais e um distinto modelo de distribuição no tecido. O significado biológico desta heterogeneidade não está esclarecido, mas a função de cada isoforma de PKC para a regulação celular está sendo investigada (NISHIZUKA, 1995). A via da PKC, a qual é regulada por metabólitos da degradação de fosfolipídeos de membrana como PIP_2 , controla a expressão de genes relacionados ao metabolismo da parede celular e desempenha um dos papéis principais durante a formação do brotamento de leveduras e provavelmente, na extensão da hifa nos fungos filamentosos (BANUETT, 1998). A PKC é uma enzima conservada entre os eucariotos. As células de mamíferos possuem 10 isoformas divididas em três classes. A ativação de PKCs pode implicar em inúmeros processos de doenças como câncer, inflamação, disfunções cardiovasculares, complicações diabéticas, desordens no sistema nervoso central e infecções por HIV. Por isto agentes que inibem as PKCs podem ter um grande valor terapêutico (KULANTHAIVEL et al., 1993). Em contraste, as leveduras têm somente uma ou duas PKCs com estruturas características às três classes de PKCs de mamíferos. Membros desta família são geralmente quinases serina/treonina e são encontradas exclusivamente em células eucarióticas. Muitas, senão todas PKCs, são componentes centrais na transdução de sinal (SCHIMITZ; HEINISCH, 2003) e participam na manutenção da integridade e crescimento da parede celular de fungos (RONEN et al., 2007). Em *Saccharomyces cerevisiae*, PKC regula a progressão do ciclo celular na fase de transição em G_1 e G_2/M (PARISENTI et al., 1999). As PKCs foram isoladas em fungos, incluindo fungos dimórficos e filamentosos, tais como *Ashbya gossypii*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *C. albicans*, *Cochliobolus heterostrophus*,

Kluyveromyces lactis, *Magnaporthe grisea*, *N. crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporothrix schenckii*, *Trichoderma reesei*, *Tuber borchii*, *T. magnatum*, *Sporothrix schenckii*, e possuem duas isozimas de PKC (ICHINOMIYA et al., 2007; SCHIMITZ; HEINISCH, 2003). Estudos recentes revelaram que o fungo *A. nidulans* possui dois supostos genes que codificam para PKC, designados *pkcA* e *pkcB*. Apenas a proteína de *pkcA* apresentou todas as características das PKCs fúngicas (HERRMANN; SPROTE; BRAKHAGE, 2006). As PKCs de *S. cerevisiae* e *S. pombe* estão envolvidas na regulação da construção da parede celular *via* inúmeros mecanismos. Em *S. cerevisiae*, o aumento da expressão da PKC_e resultou em bloqueio do ciclo celular em G1 em um processo dependente da fonte de carbono (PARISSENTI et al., 1999). Makioka et al. (2001) sugeriram a importância da ativação da PKC no processo de crescimento e encistação em *Entamoeba invadens*. PKCs clássicas requerem Ca²⁺ e fosfolípidos para sua ativação. A PKC parcialmente purificada de *Entamoeba histolítica* foi ativada para fosforilação de histona I em presença de cálcio, fosfolípido e diacilglicerol (DE MEESTER et al., 1990), sugerindo a necessidade de Ca²⁺ para sua ativação. Entretanto, a importância fisiológica das PKCs em fungos filamentosos ainda não foi totalmente elucidada (ICHINOMIYA, et al., 2007).

MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) constituem um grupo de proteínas quinases específicas para serina/treonina que funcionam em cascata de proteína quinase. Estas regulam diversas funções celulares como a osmoregulação, biossíntese da parede celular, crescimento e diferenciação. Um gene de *A. nidulans* clonado e seqüenciado, codificou a síntese de uma proteína quinase com alta similaridade a proteína quinase ativada por mitógenos. Este gene demonstrou estar envolvido na construção da parede celular e morfogênese em espécies de leveduras e foi requerido para o crescimento polarizado normal em inúmeros estágios da formação da colônia (BUSSINK; OSMANI, 1999). MAPK integra sinais de múltiplos receptores incluindo dois sistemas de componentes de sinalização que consiste de histidina quinase e seu regulador responsável. Foram identificadas nove proteínas MAPK na seqüência de genoma de *Neurospora* que correspondem àquelas encontradas em *S. pombe* e *S. cerevisiae*, indicando que o maquinário básico de MAPK é conservado entre estas espécies (GALAGAN et al., 2003). Muitas proteínas quinase e fosfatases têm relativamente ampla especificidade ao substrato e podem ser usadas em combinações variadas para alcançar distintas respostas biológicas (PAWSON; SCOTT, 1997).

1.2. Os fungos filamentosos e *Aspergillus*

Os fungos constituem um amplo e diverso grupo de eucariotos caracterizados pela formação de esporos, eficiência na secreção de enzimas extracelulares e um absorvente modo de nutrição. A maioria dos fungos são filamentosos, aeróbicos e terrestres. Eles são os mais versáteis dos eucariotos, capazes de resistir a severas dessecações, a extremos pHs, e a outros estresses ambientais. Bioquimicamente versáteis, os fungos produzem uma variedade de ácidos e enzimas, bem como metabólitos secundários. São responsáveis pela decomposição de substâncias orgânicas, causam a maior parte das enfermidades em plantas e em animais, mas são também utilizados em larga escala de processos fermentativos industriais para a produção de ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos e são ainda empregados em processos de biorremediações (BENNETT, 1997).

Como o próprio nome sugere, os fungos filamentosos crescem como filamentos cujo ápice se estende continuamente e se ramificam nas regiões subapicais pelo estabelecimento de novos eixos de polaridade e crescimento (Figura 2, pág. 8). As hifas, como são denominados tais filamentos, são formadas a partir do tubo germinativo que é emitido pelos esporos logo após o processo de germinação (HARRIS, 1999). O tubo germinativo apresenta desenvolvimento apical, estabelecendo um eixo de crescimento polarizado na ponta do tubo germinativo, fazendo com que a hifa cresça nesta direção pela deposição de parede celular (FIDDY; TRINCI, 1976). Com as divisões mitóticas dos núcleos mais próximos do ápice ocorre a formação periódica de septos. Nas hifas septadas, os núcleos do compartimento apical permanecem mitoticamente ativos e realizam divisões nucleares sincronizadas, ao contrário dos núcleos presentes nos outros compartimentos, que são bloqueados na interfase (CLUTTERBUCK, 1970). A sincronização da divisão nuclear, entretanto, é perdida quando a velocidade de crescimento diminui em resposta à limitação de carbono e nitrogênio (ROSENBERGER; KESSEL, 1967).

À medida que vão se dividindo, os núcleos precisam ser continuamente transportados para o ápice, uma vez que as hifas se estendem continuamente. Como na maioria dos fungos filamentosos, a migração nuclear em *A. nidulans* ocorre principalmente em direção ao ápice da hifa, embora uma variedade de movimentos nucleares diferentes e até retrógrados tenham sido observados (SUELMAN; FISCHER, 2000). Um dos principais componentes do processo de secreção e crescimento apical é a parede celular. Embora não seja a parede celular quem determina a polaridade, sua

organização correta é um pré-requisito necessário para o crescimento polarizado normal no gênero *Aspergillus* (DEBONO; GORDEE, 1994; BORGIA et al., 1996). A parede celular fornece suporte estrutural e mantém a forma assimétrica da célula.

Os aspergilli compreendem um grupo de fungos filamentosos que acumulam mais de 200 milhões de anos de evolução. Dentre os mais de 185 *Aspergillus*, são inúmeros os que têm um impacto na saúde humana e na sociedade, incluindo 20 patógenos humanos, bem como espécies benéficas usadas para produzir enzimas de aplicação industrial, alimentos e outros produtos de interesse comercial. Em contraste com a maioria dos aspergilli, *A. nidulans* possui um ciclo sexual bem caracterizado e um sistema genético bem desenvolvido (GALAGAN et al., 2005). A maioria das espécies de *Aspergillus* duplica seus esporos tanto por processo sexual como assexual. Alguns, incluindo *A. nidulans*, são também capazes de reproduzirem-se via ciclo parassexual. O ciclo assexual (Figura 2, pág. 8) é a maneira primária para dispersão e proteção do genoma do fungo em condições desfavoráveis (WARD et al., 2006).

O primeiro passo para a germinação é a incorporação de água, que resulta na expansão do conídio e aumento da adesão em seu substrato. O início da germinação do conídio ocorre pelo reconhecimento da fonte de carbono (preferencialmente glicose) (OSHEROV; MAY, 2001). No período de aproximadamente quatro horas ocorre a primeira divisão mitótica, sendo o tempo necessário para a quebra completa da dormência. Após 8 horas, o conteúdo citoplasmático aumenta em 10 vezes e o conteúdo de DNA aumenta em 8 vezes, ou seja, três divisões nucleares se completam sincronicamente (FIDDY; TRINCI, 1976).

Uma ampla coleção de mutantes condicionais de *A. nidulans* tem sido gerada e usada para identificar loci envolvidos em vários processos do crescimento (KAMINSKYI; HAMER, 1998). *A. nidulans* tem sido utilizado com sucesso para identificar e isolar genes envolvidos com controle do ciclo celular (RASMUSSEN et al., 1990). Selecionamentos genéticos em *A. nidulans* e *N. crassa* têm identificado numerosos mutantes que alteram a frequência de ramificações e interferem em diversos processos celulares, incluindo tráfego de vesículas, organização de membranas e controle do ciclo celular. A maioria das hifas em fungos exibe um gradiente de cálcio apical, tendo uma evidência que a dissipação deste gradiente permite a formação de ramos na ponta das hifas. Além disto, mutações que perturbam a sinalização de cálcio em *N. crassa* e *A. fumigatus* tipicamente causam hiperramificação na ponta das hifas (SEMIGUINI; HARRIS, 2008).

A maioria dos avanços em nosso entendimento sobre o ciclo de divisão celular tem advindo de análises genéticas de três fungos: as leveduras *S. pombe* e *S. cerevisiae* e o fungo filamentosos *A. nidulans*. O fungo filamentosos *A. nidulans* vem sendo usado, há muito, como modelo de organismo para investigar o ciclo da célula eucariótica, regulação do metabolismo e diferenciação celular. Muitas das espécies de *Aspergillus* são úteis nos processos industriais, tais como na produção de antibióticos, produção de metabólitos secundários, fermentações industriais, biotecnologia e na produção de enzimas comerciais (YOKOYAMA et al., 2001). O sistema genético bem caracterizado do *A. nidulans* e esta forte relação com organismos significantes para a indústria e a medicina, criam um momento ideal para o seqüenciamento deste genoma. Mais de 900 genes têm sido identificados em *A. nidulans* por construção convencional, 432 têm sido mapeados por locus, e 254 tem sido clonados e seqüenciados (WARD et al., 2006). Uma vez que as várias espécies de *Aspergillus* apresentam importância médica e industrial, estudos sobre a polaridade da hifa em *A. nidulans* irá adicionar entendimento de sua biologia ambiental, interação com hospedeiro e aos mecanismos de patogenicidade do fungo (MOMANY, 2002).

Embora os estudos em leveduras tenham fornecido um proveitoso sistema para o entendimento do controle genético do crescimento polar, os fungos filamentosos, assim como *A. nidulans*, são constituídos de células multinucleadas, e muitos aspectos do crescimento filamentosos fúngico implicam em diferentes mecanismos diferentes daqueles descritos para leveduras.

Os mecanismos que restringem e que estimulam o crescimento celular e a mitose nas células apicais em *A. nidulans* são desconhecidos.

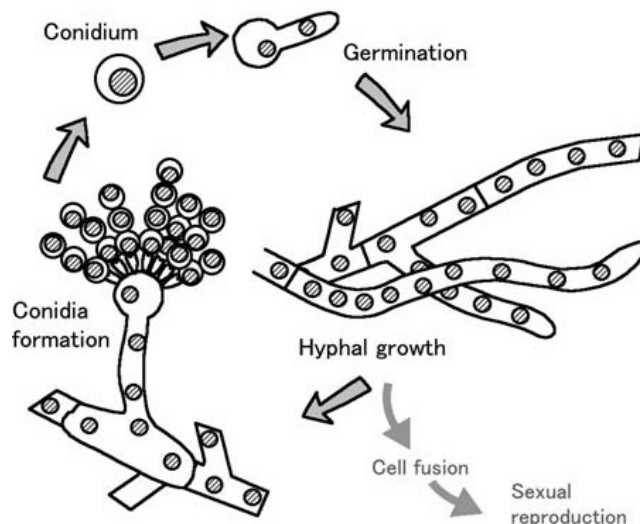


Figura 2. Esquema do ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. No ciclo de vida assexual partindo de um conídium, um esporo assexual, ocorre germinação pela extremidade do tubo germinativo, que continua crescendo para formar uma hifa madura e septada (Fonte: Horio, 2007).

1.3. O cálcio

A capacidade de espécies de microrganismos sobreviverem e responderem fisiologicamente as mudanças no seu meio ambiente permite que elas existam. Espécies de *Aspergillus* podem responder a uma variedade de mudanças ambientais (WARD et al., 2006).

O cálcio é considerado a molécula sinalizadora intracelular mais importante, e células eucarióticas possuem uma complexa ordem de canais que permeiam Ca^{2+} , bombas, transportadoras, e outras proteínas sinalizadoras de Ca^{2+} . Estes componentes do maquinário de sinalização por Ca^{2+} estão envolvidos na transdução de uma variedade de sinais externos através de numerosas respostas aos estímulos. Os níveis de Ca^{2+} citosólico livre são mantidos muito baixo (tipicamente 50-100 nmol/L) devido às bombas de Ca^{2+} ativadas, transportadores e capacidade tamponante de Ca^{2+} no citoplasma. O Ca^{2+} citosólico se torna um sinal intracelular quando esta concentração é temporariamente aumentada como resultado da ativação de canais permeáveis de Ca^{2+} , os quais recuperam seu nível original por aumentar seus transportadores. Diferentes combinações de canais de Ca^{2+} , bombas, transportadores e outras proteínas sinalizadoras de Ca^{2+} são usados pela célula para produzir sinais de Ca^{2+} com diferentes dinâmicas espaciais e características temporais (ZELTER et al., 2004). Em geral, Ca^{2+} citosólico é regulado pela operação de transportadores localizados na membrana plasmática e membranas das organelas. O Ca^{2+} externo pode entrar através dos canais

de Ca^{2+} que são distribuídos ao longo da membrana da hifa. Estoques internos podem incluir vesículas de estoques de Ca^{2+} , mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e núcleos (SILVERMAN-GAVRILA; LEW, 2001; MESSERLI et al., 2000). A concentração de Ca^{2+} citosólico livre é o maior elemento regulatório em células eucarióticas. A hifa em crescimento contém um elevado gradiente de Ca^{2+} em seu ápice que se acredita ser crucial para o estabelecimento e a manutenção do domínio apical, morfogênese e crescimento (Figura 3, pág. 11) (JACKSON; HEATH, 1993; PROKISH et al., 1997).

Concentrações de Ca^{2+} maiores que 10-100 nmol/L são necessárias para a extensão da hifa ocorrer em *N. crassa* e *Fusarium graminearum*. Em baixas concentrações, a morfologia da hifa é aberrante. A dependência de Ca^{2+} no crescimento e na morfologia pode ser devido a efeitos físicos, bioquímicos, como atividade enzimática dependente de Ca^{2+} ; fisiológicos, como a sinalização (SILVERMAN-GAVRILA; LEW, 2003). Como segundo mensageiro, Ca^{2+} pode participar nas vias de transdução de sinais de diversas atividades celulares em organismos eucarióticos, como fertilização e desenvolvimento, exocitose, contração muscular, motilidade, quimiotaxia, divisão celular, diferenciação, morte programada da célula e remodelagem de cromatina (JACKSON; HEATH, 1993; SILVERMAN-GAVRILA; LEW, 2000; NELSON et al., 2004; KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005; CARAFOLI, 2005).

Em células de levedura, o papel do Ca^{2+} na transdução de sinal está somente começando a ser elucidado. Comparado com o sistema vegetal e com o animal, sabe-se relativamente pouco sobre a sinalização por cálcio em fungos filamentosos. De modo geral, o cálcio é capaz de traduzir uma grande variedade de sinais químicos e físicos através de diferentes vias de sinalização intracelular, resultando em uma variedade de respostas (SCRASE-FIELD; KNIGHT, 2003).

Um dos motivos para esta lacuna no conhecimento sobre a sinalização por cálcio em fungos filamentosos é sem dúvida a ausência de um método rotineiro e fácil para avaliar seus níveis na hifa.

Recentemente o seqüenciamento e análise do genoma do fungo filamentoso *N. crassa* revelou que este microrganismo possui um complexo sistema de sinalização por cálcio (GALAGAN et al., 2003; BORKOVICH et al., 2004). Resultados recentes sugerem também que os níveis intracelulares de Ca^{2+} têm papel importante na adaptação a estresse de temperatura e nas mudanças morfológicas induzidas por baixas temperaturas em *N. crassa* (KAWANO; SAID, 2002). Deficiência no influxo de cálcio

seja por mutação ou por choques de temperatura resultam em alteração no crescimento polarizado das hifas, na distribuição normal dos núcleos e microtúbulos neste fungo (KAWANO; SAID, 2005).

Silverman-Gavrila e Lew (2003), estudando a dependência que o crescimento das hifas de *N. crassa* tem pelo gradiente de cálcio, sugeriram que a PLC pode ser o sensor do crescimento neste fungo.

Inúmeros tipos de antagonistas de cálcio, que interferem com processos metabólicos dependentes de Ca^{2+} , têm sido extensivamente usados para analisar o papel do Ca^{2+} na proliferação celular e diferenciação (MAKIOKA et al., 2001). Bloqueadores de canais de Ca^{2+} ou ionóforos interferem com a manutenção do gradiente na ponta da hifa e concomitantemente produzem ramificações anormais (SONE; GRIFFITHS, 1999). Inúmeros estudos têm relatado efeitos morfológicos em fungos, especificamente modificações da extensão apical e ramificações em resposta a distúrbios nos níveis de Ca^{2+} , devido também ao uso de ionóforo de cálcio (DICKER; TURIAN, 1990). Foi relatado que ionóforo de cálcio A23184 induz ramificações em *Neurospora ssp* (REISSIG; KINNEY, 1983). O crescimento de *Cercospora nicotianae* em um meio contendo A23187 resultou em severa alteração na regulação de cálcio, reduzindo a produção de cercosporina (CHUNG, 2003).

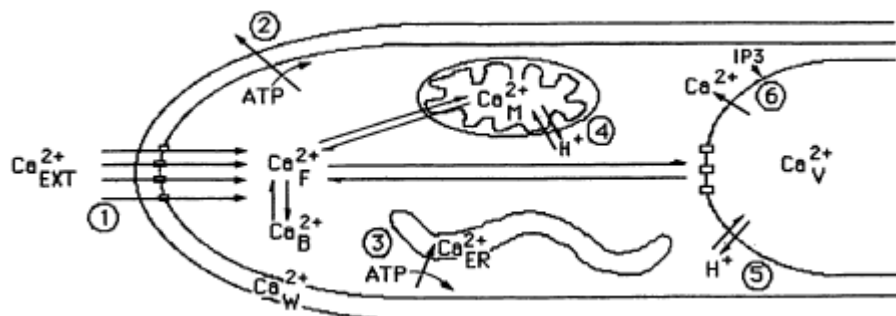


Figura 3. Fatores envolvidos com a homeostase do Ca^{2+} no fungo. Cálcio externo entra na hifa pela ponta. O Ca^{2+} interno é seqüestrado das organelas para manter o gradiente de Ca^{2+} livre no ápice.

1.4. Ca^{2+} /Calmodulina - calcineurina

Alterações nas concentrações de Ca^{2+} intracelular ocasionam diversos sinais nos diferentes tipos de células. Um dos mecanismos pelo qual o Ca^{2+} atua é ligando-se e

ativando a calmodulina (CaM) (BANDYOPADHYAY; LEE; BANDYOPADHYAY, 2004).

A CaM é altamente conservada em eucariontes e é considerada uma proteína multifuncional por causa da sua habilidade em interagir com a atividade de outras proteínas (SATO et al., 2004; VAN DER LUIT et al., 1999). Em vertebrados e *A. nidulans*, a calmodulina também requer cálcio. A calmodulina, nesta forma ativada com Ca^{2+} , é capaz de ativar ou inativar inúmeras enzimas, incluindo fosfodiesterases, adenil ciclases, canais iônicos, proteínas quinases e por último uma fosfatase, a calcineurina (SILVERMAN-GAVRILA; LEE, 2000; KAHL; MEANS, 2003). O gene que codifica a síntese de calmodulina parece ser essencial para a progressão do ciclo celular em um número de organismos eucariotos. Recentes investigações em *Entamoeba histolytica* e *E. invadens* revelaram que a calmodulina tem papel essencial no crescimento e na encistação (MAKIOKA et al., 2001). A morfogênese em *Candida albicans* foi bloqueada por Trifluoperazina, conhecido inibidor da calmodulina (SHARMA; KAUR; KHULLER, 2001). Em *A. nidulans* e *Cryptococcus neoformans* a ligação Ca^{2+} /CaM é essencial para o crescimento (JOSEPH; MEANS, 2002), assim como para *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae* e *S. pombe* (KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005).

Fármacos anti CaM produziram significativa inibição no crescimento e na progressão do ciclo celular mas, suas aplicações são limitadas uma vez que esses fármacos interagem não somente com CaM, mas com muitos outros compostos celulares, como a PKC (RASMUSSEN, et al, 1990).

Compostos fenotiazínicos, como trifluoperazina e clorpromazina, são agentes antipsicóticos e são também interessantes como fármacos antifúngicos principalmente por causa da sua ação sobre a calmodulina (SHARMA; KAUR; KHULLER, 2001). O gene que codifica para uma única multifuncional cálcio /calmodulina-dependente proteína quinase (CaMK) também é essencial em *A. nidulans*. Esta enzima é requerida tanto para o ciclo de divisão nuclear quanto para o crescimento da hifa, sendo que a ruptura do único gene CaM é letal (DAYTON; MEANS, 1996).

A enzima calcineurina atua como um efetor da sinalização de cálcio por regular o estado de fosforilação de proteínas. A calcineurina também atua em fungos controlando uma miríade de processos fisiológicos incluindo progressão do ciclo celular, homeostase de cátion e morfogênese (FOX; HEITMAN, 2002). A enzima funciona como um heterodímero contendo a subunidade catalítica A (Calcineurina A), com massa molecular de 60 kDa, e subunidade regulatória B (Calcineurina B), com

massa molecular de 19 kDa. Essas duas subunidades são essenciais para a atividade. A ativação da calcineurina ocorre quando a calcineurina B se liga ao Ca^{2+} , e a calmodulina se liga na região da calcineurina A (KOTHE; FREE, 1998). Ela é a única proteína fosfatase dependente de Ca^{2+} e CaM para esta atividade, o que a torna um dos transportadores de Ca^{2+} intracelular mais comuns. Evidências mostram que a calcineurina modula a liberação de Ca^{2+} por interagir diretamente com receptor do IP_3 (BANDYOPADHYAY; LEE; BANDYOPADHYAY, 2004).

Em *Drosophila*, a expressão da calcineurina é maior no início da fase embrionária, enquanto em *S. cerevisiae*, a calcineurina regula o transporte de íons (HORN, GROSS, 1996). No grupo ascomiceto, tem sido descrito que a calcineurina é essencial para a regulação do ciclo celular, crescimento da hifa e estress da membrana (JUVVADI et al., 2003).

Em *C. albicans*, *C. neoformans* e *A.fumigatus* foi reportado um papel essencial para a calcineurina em morfogênese, virulência e ação de fármaco antifúngico (FERREIRA et al., 2007).

Ciclosporina A (CsA) e FK506 (tacrolimus) difundem dentro da célula e se ligam a receptores intracelulares conhecidos como imunofilinas. CsA se liga a ciclofilina A, enquanto FK506 se liga a proteína FKBP12. A formação do complexo fármaco-proteína FKBP12-FK506 e ciclofilina A-CsA inibem a atividade da calcineurina. Portanto, CsA e FK506 (que são ambos comuns em uso clínico para tratar e prevenir rejeição de órgãos e tecidos transplantados) inibem a ativação das células-T por inibirem a calcineurina (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; FOX; HEITMAN, 2002; KRAUS; HEITMAN, 2003).

As funções da calmodulina e calcineurina são largamente conservadas entre fungos patogênicos e modelos de fungos, entretanto, os mecanismos de ação descritos apresentam divergências. As diferenças nas funções podem refletir a necessidade de cada patógeno em sobreviver dentro do hospedeiro, e ilustra que estudos devem ser conduzidos em cada organismo para elucidar os detalhes dos mecanismos moleculares da calmodulina e calcineurina mediada pela sinalização (BANDYOPADHYAY; LEE; BANDYOPADHYAY, 2004).

Um amplo número de proteínas sinalizadoras de Ca^{2+} têm sido previamente identificado e caracterizado em *S. cerevisiae*, mas relativamente pouco tem sido reportado para fungos filamentosos (ZELTER et al., 2004).

1.5. Fonte nutricional

O gênero *Aspergillus* é capaz de utilizar uma variedade de substratos para o crescimento e pode alternar entre diferentes rotas bioquímicas para assimilação desses vários substratos (WARD et al., 2006). O conhecimento dos mecanismos metabólicos dos fungos é de grande importância, pois permite o crescimento e desenvolvimento de um fungo em laboratórios e indústrias. Os fungos necessitam de duas classes de nutrientes: os macronutrientes, exigidos em concentração por volta de 10^{-3} mol/L, ao qual pertence o nitrogênio e os micronutrientes, requeridos em concentrações em torno de 10^{-6} mol/L ou menos, como alguns metais e vitaminas.

Glicose é um importante nutriente para as células eucarióticas e atua como um mensageiro primário nessas células. Entre as vias de sinalização envolvidas na geração dos fenômenos regulatórios induzidos por glicose, as mais estudadas são a via Ras-AMPC e a via principal de repressão por glicose (THEVELEIN, 1994; ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002). O AMPC, cuja síntese é catalisada pela adenilato ciclase a partir de ATP, é considerado um dos mais importantes mensageiros secundários nas respostas a nutrientes, pois realiza adaptações metabólicas em distintas condições de crescimento fermentativo. O AMPC, então, causa a ativação da proteína quinase A (PKA) (THEVELEIN; WINDE, 1999). A PKA controla eventos como a germinação e o crescimento polarizado em diferentes fungos, incluindo *N. crassa*, *Aspergillus niger* e *A. fumigatus* (ZIV; GOROVITS; YARDEN, 2008).

Foi relatado que a ausência de glicose causa um impetuoso aumento no nível de AMPC em *A. nidulans*, e sob condições específicas altera o número de núcleo em diferentes ascósporos (ZONNEVELD, 1976). Estes achados foram exemplos claros de como um sinal externo pode influenciar o desenvolvimento morfológico em fungos.

A presença de glicose altera várias rotas metabólicas. Adicionalmente, diferentes células eucarióticas usam mecanismos específicos para perceber a presença de glicose. O papel fisiológico destes mecanismos depende, em particular, do tipo de célula (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2001). Os efeitos regulatórios induzidos pela presença de glicose podem ocorrer tanto em nível transcricional (repressão ou indução de genes), como em nível pós-transcricional (ativação ou inativação de enzimas e de proteínas de transporte) (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002). Na presença de uma fonte de carbono rapidamente metabolizável, como D-glicose, as enzimas requeridas para a utilização de uma fonte de carbono menos favorável não são sintetizadas ou o são em baixa concentração. Em fungos filamentosos, como *A.*

nidulans, este fenômeno conhecido como regulação do carbono catabólico (RCC) é mediado pelo DNA ligado ao repressor transcricional (CreA), que previne ações do catabolismo pela fonte de carbono menos preferida, se um substrato de crescimento mais favorável estiver disponível (ILYÉS et al., 2004).

As células de leveduras são capazes de detectar a mera presença ou ausência de nutrientes, dependendo da fonte de carbono disponível, promovendo diferentes rotas metabólicas (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002).

Outro ponto ainda obscuro no desenvolvimento dos fungos é com relação à resposta de adaptação ao crescimento em uma fonte de carbono prontamente metabolizável, como glicose e outra que depende da síntese e secreção de enzimas, como pectina, xilana, celulose ou outro polissacarídeo. Há um sistema de sinalização que coordena um crescimento, inicialmente, mais lento quando a fonte de carbono não é prontamente metabolizável? Tratando-se da fonte de carbono preferencial das células eucarióticas é compreensível que a molécula de glicose possua uma importante função sinalizadora com receptores e vias de sinalizações próprias para sua percepção (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2001). O efeito da concentração extracelular de glicose na morfologia e divisão nuclear foi investigado em duas espécies do gênero *Aspergillus*, embora não se faça menção ao mecanismo e/ou via de transdução de sinais envolvidos na resposta morfológica. Altas concentrações de glicose em culturas de *A. niger* e *A. oryzae* resultaram na formação de um compartimento apical longo e com vários núcleos, enquanto que resultados opostos foram observados em baixa concentração de glicose (MULLER; SPOHR; NIELSEN, 2000).

Há um grande interesse em esclarecer como os fungos crescem e seus mecanismos de regulação, pois estes microrganismos são agentes biotecnológicos, produtores de inúmeras substâncias com finalidade de uso comercial e, além disso, são agentes patogênicos e fitopatogênicos. Assim sendo, estudar o envolvimento do Ca^{2+} na resposta de um fungo modelo como *A. nidulans* sob fontes de carbono diferentes constitui um meio de gerar conhecimentos sobre as características de crescimento dos fungos filamentosos, de sua resposta a adaptação ambiental e dos mecanismos que controlam essa resposta.

5. CONCLUSÕES

- Os níveis de Ca^{2+} citosólico na linhagem A26, crescendo em presença de glicose, foram maiores que os detectados quando o meio estava suplementado com pectina;
- O ciclo de germinação e divisão celular no mutante com depleção do gene *plc* (AP27), independentemente da fonte de carbono, mostrou-se mais lento se comparado com a linhagem A26. Provavelmente devido ao fato de seus estoques intracelulares de Ca^{2+} , tanto em nível vesicular quanto citosólico, serem menores;
- A linhagem AP27 apresentou ramificações dicotômicas nas pontas das hifas e hifas laterais em ambas as fontes de carbono nas quais foi cultivada, o que não se observou na linhagem A26;
- Quando calcineurina foi inibida por ciclosporina A, as hifas das duas linhagens, em ambas condições de cultivo, alongaram-se menos e apresentaram-se mais ramificadas, no entanto este efeito foi mais pronunciado em presença de glicose e entre as duas linhagens pode-se dizer que foi mais intenso na linhagem AP27, demonstrando a importância dos níveis de cálcio na atividade desta enzima e conseqüentemente no desenvolvimento normal das hifas;
- A liberação de Ca^{2+} , pelo ionóforo, produziu hiperramificação em ambas as linhagens, mas principalmente quando cresciam em pectina e, ao contrário do efeito observado em presença de verapamil, que bloqueia os canais de Ca^{2+} , não promoveram hifas laterais e nem pontas dicotômicas. No entanto o outro bloqueador dos canais de Ca^{2+} testado, ácido caurenóico, apresentou efeito morfológico diferente, pois as hifas tornaram-se curvas o que indica perda de polaridade;
- O inibidor da calmodulina (TFP) retardou a germinação principalmente no mutante AP27 quando crescendo em presença de glicose. Lembrando que o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ativa a calcineurina e que o mutante apresenta menores níveis de cálcio, esse resultado é justificável;
- A ruptura do gene *plcA* não impediu o crescimento e desenvolvimento do mutante provavelmente, porque a função desta enzima poder ser provida por outras partes do

genoma mas comprometeu os níveis intracelulares de cálcio e conseqüentemente a sua morfologia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA-SANCHES, F.; REYNAGA-PENA, C.G.; SALCEDO-HERNANDEZ, R.; RUIZ-HERRERA, J. Possible role of ionic gradients in the apical growth of *Neurospora crassa*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Netherlands, v.86, n.4, p.301-311, 2004.

AREVALO-RODRIGUES, M.; HEITMAN, J. Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, Washington, v.4, n.1, p.17-29, 2005.

BANDYOPADHYAY, J.; LEE, J.; BANDYOPADHYAY, A. Regulation of calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, in *C. elegans*. **Mol Cells.**, Seoul, v.18, n.1, p.10-16, 2004.

BANUETT, F. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. **Microbiol Mol Biol Rev.**, Washington, v.62, n.2, p.249-274, 1998.

BENNETT, J.W. White paper: genomics for filamentous fungi. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.21, p.3-7, 1997.

BORGIA, P.T.; IARTCHOUK, N.; RIGGLE, P.J.; WINTER, K.R.; KOLTIN, Y.; BULAWA, C.E. The chsB gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.20, p.193-203, 1996.

BORKOVICH, K.A.; ALEX, L.A.; YARDEN, O.; FREITA, G. M.; et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol Mol Biol Rev.**, Washington, v.68, p.1-108, 2004.

BRADNER, J.R.; NEVALAINEN, K.M.H. Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v.54, p.193-201, 2003.

BRUNTON A. H.; GADD G. M. Evidence for an inositol lipid signal pathway in the yeast-mycelium transition of *Ophiostoma ulmi*, the dutch elm disease fungus. **Mycol Res.**, Oxford, v.95, n.4, p.484-491, 1991.

BUSSINK, H-J; OSMANI, OSMANI, S.A. A mitogen –activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett.** Amsterdam, v.173, p.117-125, 1999.

CARAFOLI, E. Calcium-a universal carrier of biological signals. **FEBS J.**, Oxford, v.272, p.1073-1089, 2005.

CHUNG, K-R. Involvement of calcium/calmodulin signaling in Cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. **Appl Environ Microbiol.**, Washington, v.69, n.2, p.1187-1196, 2003.

CLUTTERBUCK, A.J. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol.**, Inglaterra, v.60, p.133-135, 1970.

COCCO, L.; FARENZA, I.; FIUME, R.; BILLI, A.M.; GILMOUR, R.S.; MANZOLI, F.A. Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) β 1 and nuclear lipid-dependent signaling. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1761, p.509-521, 2006.

CRUZ, M.C.; FOX, D.S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.** Oxford; v.20, n.5, p.1020-1032, 2001.

DAYTON; J.S.; MEANS, A.R. Ca(2+)/calmodulin –dependent kinase is essential for both growth and nuclear division in *Aspergillus nidulans*. **Mol Biol Cell.**, Bethesda, v.7, n.10, p.1511-1519, 1996.

DEBONO, M., GORDEE, R.S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development . **Annu Rev Microbiol.**, Palo Alto, v. 48, p.471-497, 1994.

DE MEESTER, F.; SHAW, E.; SCHOLZE, H.; STOLARSKY, T.; MIRELMAN, D. Specific labelling of cysteine proteinases in pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun.**, Bethesda, n.58, p.1396–1401, 1990.

DICKER, J.W.; TURIAN, G. Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild-type and the “frost” and “spray” morphological mutants of *Neurospora crassa*. **J Gen Microbiol.**, Inglaterra, v.136, p.1413-1420, 1990.

DRUMMOND, I.A.S.; LEE, A.S.; RESENDEZ, E.JR.; STEINHARD, R.A. Depletion of intracellular calcium stores by calcium ionophore A23187 induces the gene for glucose-related proteins in hamster fibroblasts. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.262, p.12801-12805, 1987.

FERREIRA, M.E.S.F.; HEINEKAMP, T.; HARTL, A.;BRAKHAGE, A.A.;SEMIGHINI, C.P.;HARRIS, S.D.; SAVOLDI, M.; GOUVEA, P.F.;GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.44, n.3, p.219-230, 2007.

FIDDY, C.; TRINCI, A.P. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol.**, Inglaterra, v. 97, p.169-184, 1976.

FOX, D.S.; CRUZ, M.C.; SIA, R.A.; KE, H.; COX, G.M.; CARDENAS, M.E.; HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interaction with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol.**, Oxford, v.39, p.835-849, 2001.

FOX; D.S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **BioEssay**, Cambridge, v.24, p.894-903, 2002.

GADD, G.M.; FOSTER, S.A. Metabolism of inositol 1,4,5-triphosphate in *Candida albicans*: significance as a precursor of inositol polyphosphates and in signal transduction during the dimorphic transition from yeast cells to germ tubes. **Microbiology**, Washington, v.145, p.437-448, 1997.

GALAGAN, J.E.; CALVO, S.E.; BORKOVICH, K.A.; SELKER, E.U.; READ, N.D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L.J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C.B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; LAIANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M.A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C.P.; KINSEY, J.A.; BRAUN, E.L.; ZELTER, A.; SCHULTER, U.; KOTHE, G.O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMAN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R.L.; PERKINS, D.D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R.J.; OSMANI, S.A.; DE SOUZA, C.P.C.; GLASS, L.; ORBACH, M.J.; BERGLUNG, J.A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D.O.; ALEX, L.A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D.J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M.S.; LANDER, E.S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. Genomic sequence of the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. **Nature**, Londres, v.422, p.859-868, 2003.

GALAGAN, J.E.; CALVO, S.E.; CUOMO, C. MA, L-J.; WORTMAN, J.R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S-I.; BASTURKMEN, M.; SPEVAK, C.C.; CLUTTERBUK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G.H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G.H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J.H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E.U.; ARCHER, D.B.; PENALVA, M.A.; OAKLEY, B.R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W.C.; DENNING, D.W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACKS, M.R.; OSMANI, S.A.; BIRREN, B.W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, Londres, v.438, p.1105-1115, 2005.

GAVRIC, O.; SANTOS, D.B.; GRIFFITHS, A. Mutation and divergence of the phospholipase C gene in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.44, p.242-249, 2007.

GUIDE SIGNAL TRANSDUCTION RESOURCE. Produced by Promega. Disponível em: http://www.promega.com/guides/sigtrans_guide/Default.htm. Acesso em: 18 nov. 2007.

HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E. As bases farmacológicas da terapêutica. In: **Goodman e Gilman: Farmacodinâmica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 2003, p.22-34.

HARRIS, S.D. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. **Microbiology**, Washington, v.145, p.2747-2756, 1999.

HERRMANN, M.; SPROTE, P.; BRAKHAGE, A.A. Protein Kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in Penicillin production. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.72, n.4, p.2957-2970, 2006.

HORIO, T. Role of microtubules in tip growth of fungi. **J Plan Res.**, Toquio, v.60, p.120-153, 2007.

HORN, F.; GROSS, J. A role for calcineurin in *Dictyostetium discoideum* development. **Differentiation**, Oxford, v.60, p.269-275, 1996.

ICHINOMIYA, M.; UCHIDA, H.; KOSHI, Y.; OHTA, A.; HORIUCHI, H. A protein kinase C-encoding gene, *pkcA*, is essential to the viability of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Biosci Biotechnol Biochem.**, Toquio, v.71, p.2787-2799, 2007.

ILYÉS, H.; FEKETE, E.; KARAFFA, L.; FEKETE, E.; SANDOR, E.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C.P. CreA-mediated carbon catabolite repression of β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.235, n.1, p.147-151, 2004.

JACKSON, S.L.; HEATH, I.B. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. **Microbiol Rev.**, Washington, v.57, p.367-382, 1993.

JIN-CHUAN, Y.; ZONG-GUI, W.; XIAN-TAO, K.; REN-QIAN, Z.; LIN-ZEN, Z. Effect of CD40-CD40 ligand interaction on diacylglycerol –protein kinase C and inositol trisphosphate- Ca^{2+} signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v.337, p.133-140, 2003.

JOSEPH, J.D.; MEANS, A.R. Calcium binding is required for calmodulina function in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell.**, Washington, v.1, n.1, p.119-125, 2002.

JUN, Y.; FRATTI, R.A.; WICKNER, W. Diacylglycerol and its formation by phospholipase C regulate Rab- and SNARE-dependent yeast vacuole fusion. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.51, p.53186-53195, 2004.

JUNG, O.J.; LEE, E.J.; KIM, J.W.; CHUNG, Y.R.; LEE, C.W. Identification of putative phosphoinositide-specific phospholipase C genes in filamentous fungi. **Mol Cells.**, Seoul, v.7, n.2, p.192-199, 1997.

JUVVADI, P.R.P.; KUROKI, Y.; ARIOKA, M.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Functional analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: evidence for its putative role in stress adaptation. **Arch Microbiol.**, Nova Iorque, v.179, p.416-422, 2003.

KAWANO, C.Y.; SAID, S. Morphological alterations induced by cold-shock in *Neurospora crassa*. **J Basic Microbiol.**, Berlin, v.42, p.381-387, 2002.

KAWANO, C.Y.; SAID, S. Hyperbranching induced by cold-shock or *snow-flake* mutation in *Neurospora crassa* is prevented by addition of exogenous calcium. **J Basic Microbiol.**, Berlin, v. 45, p.199-206, 2005.

KAMINSKYJ, S.G.; HAMER, J.E. *hyp* loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of *Aspergillus nidulans* **Genetics**, Baltimore, v.148, p.669-680, 1998.

KAHL, C.; MEANS, A. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. **Endocr Rev.** Baltimore, v.24, n.6, p.719-736, 2003.

KOCH, G.; SMITH, M.; MACER, D.; WEBSTER, P.; MORTARA, R. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmic. **J Cell Sci.** Londres, v.86, p.217-232, 1986.

KOTHE, G.O.; FREE, S.J. Calcineurin subunit B is required for normal vegetative growth in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.23, p.248-258, 1998.

KRAUS, P.R.; HEITMAN, J. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. **Biochem Biophys Res Commun.**, Nova Iorque, v.311, n.4, p.1151-1157, 2003.

KRAUS, P.R.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Calcium –and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukariot Cell**, Washington, v.4, n.6, p.1079-1087, 2005.

KULANTHAIVEL, P.; HALLOCK, Y.F.; BOROS, C.; HAMILTON, S.M.; JANZEN, W.P.; BALLAS, L.M.; LOOMIS, C.R.; JIANG, J.B. Balanol: a novel and potent inhibitor of protein kinase C from the fungus *Verticillium balanoides*. **J Am Chem Soc.**, Washington, v.115, p.6452-6453, 1993.

KUNZE, D.; MELZER, I.; BENNETT, D.; SANGLARD, D.; MACCALLUM, D.; NORSKAU, J.; COLEMAN, D.C.; ODDS, F.C.; SHAFER, W.; HUBE, B. Functional analysis of the phospholipase C gene *CaPLC1* and two unusual phospholipase C genes, *CaPLC2* and *CaPLC3*, of *Candida albicans*. **Microbiology**, Washington, v.151, p.3381-3394, 2005.

LASS-FLORL, C.; WIEDAUER, B.; MAYR, A.; KIRCHMAIR, M.; JENEWEIN, I.; LEDOCHOWSKI, M.; DIERCH, M.P. Antifungal properties of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. In vitro. **Int J Med Microbiol.**, Jena, v.291, p.655-657, 2002.

LIN, X.; MOMANY, M. Identification and complementation of abnormal hyphal branch mutants *ahbA1* and *ahbB1* in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.41, p.998-1006, 2004.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Sinalização intercelular. In: LODISH, H. **Biologia Molecular e Celular**, 4º ed., Nova Iorque, W.H. Freeman and Company, 2000, p.849-884.

MAKIOKA, A.; KUMAGAI, M.; OHTOMO, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystations of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. **Parasitol Res.**, Nova Iorque, v. 87, p.833-837, 2001.

MESSERLI, M.A.; CRETON, R.; JAFFE, L.F.; ROBINSON, K.R. Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca²⁺ during pollen tube growth. **Dev Biol.**, San Diego, n.1, v.222, p.84-98, 2000.

MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. **Curr Opin Microbiol.**, Londres, v.5, p.580-585, 2002.

MULLER, C.; SPOHR, A.B.; NIELSEN, J. Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*. **Biotechnol Bioeng.**, Nova Iorque, v.67, n.4, p.390-397, 2000.

NELSON, G.; KOZLOVA-ZWINDERMAN, O.; COLLINS, A.J.; KNIGHT, M.R.; FINCHAM, J.R.S.; STANGER, C.P.; RENWICK, A.; HESSING, J.G.M.; PUNT, P.J.; VAN den HONDEL, C.A.M.J.J.; READ, N.D. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin. **Mol Microbiol.**, Oxford, v.52, n.5, p.1437-1450, 2004.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J.**, Bethesda, v.9, p.484-496, 1995.

OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanism of conidial germination. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.199, p.153-160, 2001.

PARISSENTI, A.M.; VILLENEUVE, D.; KIRWAN-RHUDE, A.; BUSCH, D. Carbon source-dependent regulation of cell growth by murine protein kinase C epsilon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Physiol.**, Nova Iorque, v.178, p.216-226, 1999.

PAWSON, T.; SCOTT, J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**, Washington, v.278, p.2075-2080, 1997.

PROKISCH, H.; YARDEN, O.; DIEMINGER, M.; TROPSCHUG, M.; BARTHELMESS, I. Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. **Mol Gen Genet.**, Nova Iorque, v.256, p.104-114, 1997.

RASMUSSEN, C.D.; MEANS, R.L.; LU, K.P.; MAY, G.S.; MEANS, A. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.265, n.23, p.13767-13775, 1990.

REISSIG, J. L.; KINNEY, S.G. Calcium as a branching signal in *Neurospora crassa*. **J Bacteriol.** Washington, v.154, p.1397-1402, 1983.

RODRIGUES, A.G.; PINA-VAZ, C.; MARDH, P.A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA J., FREITAS-DA-FONSECA, A. Inhibition of germ tube formation by *Candida albicans* by local anesthetics: an effect related to ionic channel blockade. **Curr Microbiol.**, Nova Iorque, v.40, p.145-148, 1999.

RODRIGUES, A.G.; ARAUJO, R.; PINA-VAZ, C. Interaction of local anaesthetics with other antifungal agents against pathogenic *Aspergillus*. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v.27, p.339-343, 2006.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing mechanisms in eucaryotic cells. **Trends Biochem Sci.**, Londres, v.26, n.5, p.310-317, 2001.

ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM. Glucose-sensing and –signalling mechanisms in yeast. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.2, p.183-201, 2002.

RONEN, R.; SHARON, H.; LEVDANSKY, E.; ROMANO, J.; SHADKCHAN, Y.; OSHEROV, N. The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. **Curr Genet.**, Nova Iorque, v.51, p.321-329, 2007.

ROSENBERGER, R.F.; KESSEL, M. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. **J Bacteriol.**, Baltimore, v. 94, n.5, p.1464-1469, 1967.

ROTH-BEJERANO, N.; MENDLINGER, S.; KAGAR-ZUR, V. Effect of calcium on growth of submerged *Terfezia boudieri* mycelium. **Mycoscience**, Toquio, v.45, p.30-34, 2004.

SATO, T.; UENO, Y.; WATANABE, T.; MIKANI, T.; MATSUMOTO, T. Role of Ca^{2+} /Calmodulin signaling pathway on morphological development of *Candida albicans*. **Biol Pharm Bull.**, Toquio, v.27, n.8, p.1281-1284, 2004.

SCHMITZ, H-P.; HEINISCH, J.J. Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. **Curr Genet.**, Nova Iorque, v.43, p.245-254, 2003.

SCRASE-FIELD, S.A.M.G.; KNIGHTY, M.R. Calcium: just a chemical switch? **Curr Opin Plant Biol.**, Londres, v.6, p.500-506, 2003.

SEMIGUINI, C.P.; HARRIS, S.D. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. **Genetics**, Baltimore, v.179, p.1919-1932, 2008.

SHARMA, S.; KAUR, H.; KHULLER, G.K. Cell cycle effects of the phenothiazines: trifluoperazine and chlorpromazine in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Lett**, Chandigarh, v. 199, p.185, 2001.

SILVERMAN-GAVRILA, L.B.; LEW, R.R. Calcium and tip growth in *Neurospora crassa*. **Protoplasma**, Viena, v.213, p.203-217, 2000.

SILVERMAN-GAVRILA, L.B.; LEW, R. Regulation of the tip-high $[Ca^{2+}]$ gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa*. **Eur J Cell Biol**, Stuttgart, v.80, p.379-390, 2001.

SILVERMAN-GAVRILA, L.B.; LEW, R.R. An IP_3 -activated Ca^{2+} channel regulates fungal tip growth. **J Cell Sci.**, Londres, n.115, v.24, p.5013-5025, 2002.

SILVERMAN-GAVRILA, L.B.; LEW, R.R. Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. **Microbiol**, Berks, v.149, p.2475-2485, 2003.

SONE, T.; GRIFFITHS, A.J.F. The frost gene of *Neurospora crassa* is a homolog of yeast *cdc1* and affects hyphal branching via manganese homeostasis. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.28, p.227-327, 1999.

SUELMANN, R.; FISCHER, R. Nuclear migration in fungi-different motors at work. **Res Microbiol.**, Amsterdam, v.151, p.247-254, 2000.

THEVELEIN, J.M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, Nova Iorque, v.10, n.13, p.1753-1790, 1994.

THEVELEIN, J.M.; WINDE, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol.**, Oxford, v.33, p.904-918, 1999.

TIRAPELLI, C.R., AMBROSIO, S. R., DA COSTA, F. B., de OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.73, p.56-62, 2002.

TIRAPELLI, C. R., AMBROSIO, S. R., DA COSTA, F. B., COUTINHO, S. T., de OLIVEIRA, D. C. R, de OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol**, Amsterdam, v.492, p.233-240, 2004.

TORRALBA, S.; HEATH, I.B. Cytoskeletal and Ca^{2+} regulation of hyphal tip growth and initiation. **Curr Top Dev Biol.**, Nova Iorque, v.51, p.135-187, 2001.

VAN DER LUIT, A.H., OLIVARI, C.; HALEY, A.; KNIGHT, M.R.; TREWAVAS, A. T. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in Tobacco. **Plant Physiol.**, Rockville, v.121, p.705-714, 1999.

VANZELA, A.P.F.C.; SAID, S. Evidence for carbon source regulated protein kinase A and protein kinase C signaling in the duplication cycle, polarization and septum formation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol Res.** Jena, v.157, 239-247, 2002.

VIRAG, A.; GRIFFITHS, A.J.F. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.41, p.213-225, 2004.

WARD, O.P.; QIN, W.M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. **Adv Appl Microbiol.**, Nova Iorque, v.58, p.1-55, 2006.

YOKOYAMA, K.; WANG, L.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Identification of the *Aspergillus* section *Nigri*, inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.200, p. 241-246, 2001.

ZELTER, A.; BENCINA, M.; BOWMAN, B.J.; YARDEN, O.; READ, N.D. A comparative genomic analysis of the calcium signaling machinery in *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.41, p.827-841, 2004.

ZIV, C.; GOROVITS, R.; YARDEN, O. Carbon source affects PKA-dependent polarity of *Neurospora crassa* in a CRE-1-dependent and independent manner. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.45, p.103-116, 2008.

ZONNEVELD, B.J.M. The effect of glucose and manganese on adenosine -3',5'-monophosphate levels during growth and differentiation of *Aspergillus nidulans*. **Arch Microbiol.**, Berlin, v.108, p.41-44, 1976.

