UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VICENTE DE PAULO MARTINS

Respiração mitocondrial, Fosforilação oxidativa,
clonagem e expressão heteróloga de uma oxidase
alternativa de *Paracoccidiodes brasiliensis*

RIBEIRÃO PRETO
2007

VICENTE DE PAULO MARTINS

**Caracterização bioenergética da forma leveduriforme de
P. brasiliensis: estudos bioquímicos e moleculares de
vias mitocondriais alternativas**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

RIBEIRÃO PRETO

2007

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Vicente de Paulo.

Caracterização bioenergética da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*: estudos bioquímicos e moleculares de vias mitocondriais alternativas / Vicente de Paulo Martins; orientador Sérgio Akira Uyemura.- Ribeirão Preto, 2007.

210 p. il.; 30 cm

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*.
2. Bioenergética. 3. Vias mitocondriais alternativas. 4. Expressão heteróloga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vicente de Paulo Martins

Caracterização bioenergética da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*: estudos bioquímicos e moleculares de vias mitocondriais alternativas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

*À toda minha família pelos ensinamentos
que não aprendemos nos livros,
como humildade, honestidade...
meus pais Sebastião e Darci;
meus irmãos Marli, Francisco e Sebastião;
minhas cunhadas Maira, Valquíria
e aos meus maravilhosos sobrinhos:
Ricardo, Natiely, Isabela, Euler e Caroline.
Vocês estão sempre em meus pensamentos!*

*À minha nova família pelo apoio e compreensão,
meus sogros José Canavaci e Sueli;
minha cunhada Giselle e seu esposo Glauco.
Vocês são muito importantes para mim!*

*E especialmente à minha esposa Adriana,
que a sete anos ilumina minha vida
tornando-a mais leve e alegre.
Viva por ti!!*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, pelos exemplos de postura ética e comprometimento com o ensino, a pesquisa e a manutenção da Universidade Pública, assim como, por me receber e orientar em seu laboratório desde a iniciação científica;
- Ao amigo Frederico Marianetti Soriani, pela paciência e companheirismo, orientando-me desde os meus primeiros passos na área de Bioquímica e Biologia Molecular;
- Às amigas Valéria Tudella Uyemura e Taisa Magnani, pela amizade e apoio, durante todo o tempo que estive no laboratório, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento do nosso trabalho;
- Às amigas Flávia Martinelo, Patrícia Paschoarelli e Anna Carolina Policarpo pelo apoio e discussões sobre meu trabalho, principalmente pela amizade e bons momentos que passamos no laboratório;
- Aos funcionários João José Franco, Antonio Zanardo Filho e Nancy Maria Ferreira Rodrigues do laboratório de Bioquímica-Clínica da FCFRP-USP, pelo apoio e orientação técnica ao longo deste projeto;
- Ao Prof. Dr. Carlos Curti do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP por disponibilizar seu laboratório;
- Aos Prof(a)s.: Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dra. Yara Lucisano Valin, Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi e Dra. Carem Gledes Rechia do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP por disponibilizarem o laboratório de Bioquímica para a realização de meu trabalho e pela

orientação, por 2 semestres, no programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE).

- Aos funcionários e alunos de pós-graduação e iniciação científica do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP, pelo apoio e orientação durante meu trabalho e o estágio PAE;
- À Prof.Dra.Nádia Monesi do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, pela orientação durante o estágio PAE e principalmente pelo apoio e discussões científicas, que contribuíram para o desenvolvimento de minha pesquisa;
- Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP por disponibilizar seu laboratório;
- Às Dras. Marcela Savoldi e Márcia Eliana da Silva Ferreira, pela contribuição indispensável nos experimentos de PCR em Tempo-real;
- À Profa.Dra. Cristina Nonato do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, pelas sugestões e por disponibilizar seu laboratório para a realização de meu trabalho;
- Aos Prof(a)s.: Dra. Julieta Mieko Ueta, Dra. Ilda Kazumi Shuhama, Dr. Tadao Shuhama (in memoriam) e Dr. Oswaldo de Freitas, pela amizade e orientação nos meus primeiros anos de iniciação científica;
- Aos amigos Rodrigo Haddad e Sheila Maria, que não estão mais no laboratório, mas sempre dispostos a me ajudar;

- A todos os funcionários da seção de Pós-Graduação, Rosana, Eleni, Ana e Carlos por sempre me atenderem com atenção e carinho;
- À Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (Fapesp), por financiar o laboratório possibilitando o desenvolvimento de minha pesquisa;
- À Coordenação de aprimoramento de pessoal de nível superior (Capes), por conceder-me a bolsa de doutorado direto, a qual permitiu minha dedicação integral ao projeto.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xiii
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1- Aspectos gerais.....	2
1.2- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2
1.2.1- Características macro e microscópicas.....	3
1.2.2- Patogênese.....	4
1.3- Função mitocondrial.....	6
1.4- Componentes mitocondriais alternativos.....	11
1.4.1- NADH desidrogenase alternativa.....	13
1.4.2- Oxidase alternativa.....	15
1.5- Relação entre vias mitocondriais clássicas e alternativas com a geração de EROs.....	18
1.6- Potencial quimioterapêutico da oxidase alternativa e NADH desidrogenase alternativa.....	20
2- OBJETIVOS.....	24
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1- Soluções e tampões.....	27
3.1.1- Tampão de pré-incubação para esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	27
3.1.2- Tampão de digestão para esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	27
3.1.3- Tampão de respiração para esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	27
3.1.4- Tampão para titulação do potencial de membrana.....	27
3.1.5- Salina fosfato tamponada (PBS).....	28
3.1.6- Tampão de extração de DNA.....	28
3.1.7- Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE).....	29

3.1.8- Tampão Tris-EDTA (TE) 1X.....	29
3.1.9- Tampão de carregamento de DNA em gel de agarose.....	29
3.1.10- RF1.....	30
3.1.11- RF2.....	30
3.1.12- Tampão para lise de <i>E. coli</i> e extração de plasmídeos.....	30
3.1.13- Tampão de lise 1.....	31
3.1.14- Acetato de Lítio 1X.....	31
3.1.15- Tampão de pré-incubação para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.1.16- Tampão de digestão para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.1.17- Tampão de lise-1 para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.1.18- Tampão de lise-2 para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.1.19- Tampão de mitocôndria para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.1.20- Tampão de lise para levedura	32
3.1.21- preparo de géis para SDS-PAGE.....	33
3.1.22- Tampão de amostra 2X concentrado.....	33
3.1.23- Tampão de corrida Tris/Glicina.....	34
3.1.24- Solução corante de Comassie.....	34
3.1.25- Solução descolorante.....	34
3.1.26- Tampão de transferência (Western blotting)....	34
3.1.26- TBS-T.....	34
3.2- Meios de cultivo.....	35
3.2.1- FAVA-NETO.....	35
3.2.2- Sabouraud Dextrose Agar.....	35
3.2.3- PGY.....	36
3.2.4- LB (Lúria Bertani).....	36
3.2.5- SOC.....	37
3.2.6- SOB.....	37

3.2.7- YPD.....	37
3.2.8- SC (meio mínimo).....	38
3.3- Organismos.....	39
3.3.1- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	39
3.3.2- Bactérias.....	40
3.3.3- <i>S. cerevisiae</i>	40
3.4- Teste de viabilidade de células fúngicas.....	41
3.5- Produção de esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	41
3.6- Medidas de consumo de oxigênio.....	43
3.7- Potencial de membrana mitocondrial.....	43
3.8- Curva de crescimento da forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	45
3.9- Extração de RNA, quantificação e eletroforese.....	46
3.10- RT-PCR.....	47
3.11- PCR quantitativo em tempo real (Q Real-time PCR).....	48
3.12- Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em <i>P. brasiliensis</i>	51
3.13- Isolamento do DNA.....	52
3.14- Determinação da qualidade do DNA isolado.....	53
3.15- Eletroforese em gel de agarose.....	53
3.16- Clone do gene da Oxidase alternativa de <i>P. brasiliensis</i>	54
3.17- Análise do gene e seqüência de aminoácidos deduzidos.....	54
3.18- Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos (Primers).....	55
3.19- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
3.20- Inserção do DNA em Plasmídeo de clonagem e seqüenciamento.....	56
3.21- Preparo de células de <i>E. coli</i> competentes.....	57
3.21.1- <i>E. coli</i> cepas XL1-Blue e DH5- α	57
3.21.2- <i>E. coli</i> cepa Rosetta(DE3)pLysS™.....	57

3.22- Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes.....	59
3.23- Isolamento dos plasmídeos.....	60
3.24- Digestão do plasmídeo de clonagem e seqüenciamento.....	61
3.25- Preparo e seqüenciamento das amostras selecionadas.....	61
3.26- Clonagem do gene <i>aoxPb</i> nos vetores de expressão pET-28a(+) (Novagen), pYES2 (Invitrogen) e pYES2-NCT (Invitrogen).....	62
3.27- Análise da Clonagem do gene <i>aoxPb</i> nos vetores de expressão.....	63
3.28- Indução, em pequena escala, da expressão do gene <i>aoxPb</i> em <i>E. coli</i>	64
3.29- Preparo de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes e transformação.....	66
3.30- Indução, em pequena escala, da expressão do gene <i>aoxPb</i> em <i>S. cerevisiae</i>	67
3.31- Produção de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> e purificação de mitocôndrias.....	68
3.32- Determinação da concentração de proteínas (método de Biureto).....	70
3.33- Determinação da concentração de proteínas (método de Bradford).....	70
3.34- Preparo das amostras para a análise eletroforética em SDS-PAGE.....	71
3.35- SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio).....	71
3.36- Western Blot.....	
3.37- Determinação da produção de Eros em células fúngicas.....	74
3.38- Drogas indutoras de estresse oxidativo e expressão do gene <i>aoxPb</i> em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	75

3.39- Sistemas de registro de imagens.....	76
3.40- Análises estatísticas.....	76
4- RESULTADOS.....	78
4.1- Medidas do potencial de membrana mitocondrial e consumo de oxigênio em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	79
4.1.1- Medidas do consumo de oxigênio por esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	80
4.1.1.1- Consumo de oxigênio resistente à inibição por cianeto e antimicina A em <i>P. brasiliensis</i>	86
4.1.1.2- Consumo de oxigênio resistente á inibição por rotenona e sensível a flavona em <i>P. brasiliensis</i>	88
4.1.2- Medidas do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	90
4.2- Análise da expressão gênica de componentes da cadeia respiratória em leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , durante sua curva de crescimento.	100
4.3- Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em <i>P. brasiliensis</i>	104
4.4- Determinação da produção de EROs em <i>P. brasiliensis</i>	109
4.5- Drogas indutoras de estresse oxidativo e expressão do gene <i>aoxPb</i> em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	110
4.6- Estudos moleculares e de atividade da oxidase alternativa e de seu gene <i>aoxPb</i>	112
4.6.1- Extração de DNA da forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	112
4.6.2- Amplificação do gene <i>aoxPb</i> a partir de DNA genômico.....	113
4.6.3- Análises da seqüência do gene <i>aoxPb</i> e da proteína deduzida.....	115

4.6.4- Expressão heteróloga do gene <i>aoxPb</i> em <i>E. coli</i>	119
4.6.5- Imunodeteção de AOX Pb com anticorpo anti-cauda de histidinas.....	124
4.6.6- Avaliação da atividade oxidase alternativa em <i>E. coli</i>	125
4.6.7- Expressão heteróloga do gene <i>aoxPb</i> em <i>S. cerevisiae</i>	128
4.6.7.1- Amplificação do gene <i>aoxPb</i> e clonagem em plasmídeos de expressão pYES2 e pYES2-NCT..	128
4.6.7.2- Imunodeteção de AOX Pb com anticorpo anti-cauda de histidinas.....	132
4.6.7.2- Avaliação da atividade oxidase alternativa em <i>S. cerevisiae</i>	133
4.6.7.3- Influência da Aox no crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	136
4.6.7.3- Determinação da produção de EROs em <i>S. cerevisiae</i>	139
5- DISCUSSÃO.....	141
5.1- Estudos bioenergéticos, <i>in situ</i> , em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	142
5.2- Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em <i>P. brasiliensis</i>	162
5.3- Efeito de inibidores da cadeia respiratória e indutores de estresse oxidativo sobre a geração de EROs e expressão do gene <i>aoxPb</i> em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	164
5.4- Estudos moleculares envolvendo a atividade da oxidase alternativa e seu gene <i>aoxPb</i>	168
6- CONCLUSÕES.....	175
7- BIBLIOGRAFIA.....	178
8- ANEXOS.....	204

*Lista de abreviaturas,
siglas e símbolos*

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

1 Kb Plus	Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases
°C	Graus celsius
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Ant. A	Antimicina A
aoxPb	Gene da alternativa oxidase de <i>P. brasiliensis</i>
AOXPb	Proteína alternativa oxidase de <i>P. brasiliensis</i>
AOXPbCT	AOXPb com cauda de histidinas na região C-terminal
AOXPbNCT	AOXPb com cauda de histidinas nas regiões C e N-terminal
ATP	Adenosina trifosfato
BHAM	Ácido benzohidroxâmico
BSA	Albumina de soro bovino
cm	centímetro
D.O.	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DTT	ditiotreitol
e⁻	Elétron
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAM	6-carboxifluoresceína
FCCP	Carbonil cianeto <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flav	Flavona

FMN	Flavina mononucleotídeo
GMP	Guanosina monofosfato
H⁺	Próton
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kb	Kilo bases
KCN	Cianeto de potássio
kDa	Kilo Daltons
Kgf	Quilograma força
mA	Miliamper
mV	Milivolts
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
Ndh	NADH desidrogenase alternativa
ORF	"open reading frame" região aberta de leitura
p/v	Relação peso por volume
PBS	Salina fosfato tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
Rot	Rotenona
RT-PCR	PCR com a enzima transcriptase reversa
SC-URA⁻	Meio de cultura Sc sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SHAM	Ácido salicil hidroxâmico
Subst.	Substratos ligados ao complexo I
Succ	Succinato
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina

<i>TMFD</i>	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilenediamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UFC	Unidades formadoras de colônia
UQ	Ubiquinona
UTR	"untranslated region" região não traduzível
v/v	Relação volume por volume
ΔpH	Diferença de potencial químico
$\Delta \Psi$	Diferença de potencial elétrico
μm	micrometro

Lista de figuras

Lista de figuras

1-	Representação esquemática dos principais componentes da cadeia respiratória e vias mitocondriais envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa em mamíferos.....	9
2-	Representação esquemática dos componentes clássicos e alternativos, da cadeia respiratória mitocondrial e vias metabólicas, envolvidos nos processos de fosforilação oxidativa em fungos e plantas.....	13
3-	Consumo de oxigênio em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i> , referentes a células da fase de crescimento exponencial...	81
4-	Influência de substratos do Complexo I e NAD ⁺ no consumo de oxigênio em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	83
5-	Avaliação da atividade oxidase alternativa em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	87
6-	Avaliação da atividade NADH desidrogenase alternativa em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	89
7-	Titulação do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	91
8-	Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	92
9-	Influência do estágio de crescimento celular sobre o potencial de membrana mitocondrial, na presença de substratos do complexo I e NAD ⁺	95
10-	Influência de substratos do complexo I e NAD ⁺ sobre o potencial de membrana, em esferoplastos de <i>P. brasiliensis</i>	99
11-	Nível de expressão do gene <i>aoxPb</i> em diferentes tempos durante a curva de crescimento do fungo <i>P. brasiliensis</i> ...	101
12-	Nível de expressão dos genes <i>nd6Pb</i> e <i>ndhPb</i> em diferentes tempos ao longo da curva de crescimento do fungo <i>P. brasiliensis</i>	102

13-	Relação entre o nível de expressão dos genes <i>nd6Pb</i> e <i>ndhPb</i> em diferentes tempos ao longo da curva de crescimento do fungo <i>P. brasiliensis</i>	103
14-	Imagens da conversão micélio/levedura em <i>P. brasiliensis</i> na presença de inibidores da cadeia respiratória.....	106
15-	Geração de EROs em células de <i>P. brasiliensis</i>	110
16-	Aumento no nível de expressão do gene <i>aoxPb</i> em função de drogas geradoras de estresse oxidativo.....	111
17-	DNA extraído por disrupção mecânica da parede celular da forma leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	113
18-	Amplificação do gene <i>aoxPb</i> por reações de PCR a partir de DNA genômico e cDNA.....	114
19-	Seqüência nucleotídica do gene <i>aoxPb</i> , aminoácidos deduzidos e principais aminoácidos ligados aos sítios de atividade enzimática.....	117
20-	Análise comparativa da hidropaticidade de seqüências de aminoácidos deduzidas de genes da oxidase alternativa	118
21-	Alinhamento das quatro principais regiões conservadas dentre as Aox _s 1-LET, 2-NERMHL, 3-LEEEA e 4-RADE-H.....	119
22-	Fotografia de SDS-PAGE com proteínas presentes em amostras coletadas de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS.....	122
23-	Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pET28 <i>aoxPb</i>	123
24-	Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pET28 <i>aoxPbCT</i>	123
25-	Fotografia de Western Blot realizado para a detecção da AOX <i>PbCT</i> expressa com cauda de histidina.....	125
26-	Inibição do consumo de oxigênio em <i>E. coli</i> pela adição de KCN.....	126
27-	Consumo de oxigênio resistente a KCN ou antimicina A e sensível a SHAM, em <i>E. coli</i>	127
28-	Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pYES <i>aoxPb</i>	130
29-	Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pYES <i>aoxPbNCT</i>	131
30-	Fotografia de Western Blot realizado para a detecção da proteína AOX <i>Pb</i> -NCT expressa em <i>S. cerevisiae</i>	133

31-	Inibição do consumo de oxigênio pela adição de KCN em <i>S. cerevisiae</i>	134
32-	Consumo de oxigênio resistente a KCN em <i>S. cerevisiae</i> . Os experimentos foram realizados em meio de cultura SC.....	135
33-	Curva de crescimento das células de <i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pYESaoxPb e <i>S. cerevisiae</i> INVSc1/pYES2.....	139
34-	Influência da expressão do gene <i>aoxPb</i> na geração de EROs em células de <i>S. cerevisiae</i>	140
35-	Representação da hipótese para a integração entre componentes clássicos e alternativos da cadeia respiratória mitocondrial com vias metabólicas citosólicas, nos processos de fosforilação oxidativa em leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	161

Lista de tabelas

Lista de tabelas

1-	<i>Linhagens de E. coli e seus genótipos.....</i>	40
2-	<i>Primers utilizados em experimentos de Real-Time.....</i>	49
3-	<i>Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos primers.....</i>	51
4-	<i>Primers utilizados na amplificação do gene aoxPb para clonagem em plasmídeos de expressão.....</i>	55
5-	<i>Oxidação de diferentes substratos por esferoplastos de P. brasiliensis.....</i>	85
6-	<i>Efeito da expressão heteróloga do gene aoxPb sobre o consumo de oxigênio em E. coli Rosetta™ (DE3)pLysS.....</i>	128
7-	<i>Efeito da expressão heteróloga do gene aoxPb sobre o consumo de oxigênio, em S. cerevisiae.....</i>	136

Resumo

MARTINS, V.P. **Caracterização bioenergética da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*: estudos bioquímicos e moleculares de vias mitocondriais alternativas.** 2007. 210 F. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma das micoses sistêmicas humanas mais prevalentes na América Latina. Componentes da cadeia respiratória mitocondrial são potenciais alvos quimioterapêuticos. Nesse sentido, em nosso trabalho demonstramos diferenças entre a cadeia respiratória do fungo *P. brasiliensis* e do hospedeiro mamífero. A respiração, potencial de membrana e fosforilação oxidativa mitocondrial de esferoplastos de *P. brasiliensis* foram avaliados *in situ*, os quais demonstraram a presença de uma cadeia respiratória funcional. A adição de ADP induziu a transição da respiração do estado de repouso para o fosforilativo, em esferoplastos energizados com succinato, NADH, NAD^+ e substratos ligados ao complex I. A presença de uma NADH-ubiquinona oxidoreductase foi demonstrada pela capacidade das células oxidarem NADH exógeno, assim como, pela respiração insensível a rotenona e sensível a flavona. Além disso, a respiração mantida por NAD^+ foi sensível a rotenona e flavona, sugerindo que vias metabólicas citosolicas contribuem para a produção de NADH e substratos ligados ao complexo I. Foi demonstrado também que os níveis de expressão do complexo I e da NADH desidrogenase alternativa alternam-se durante a curva de crescimento de leveduras de *P. brasiliensis*. A respiração induzida por NADH ou succinato foi parcialmente inibida por KCN ou antimicina A e sensível à inibição por BHAM, indicando a presença de uma oxidase alternativa. A fim de se caracterizar esta enzima oxidase alternativa, o seu gene foi clonado e expressado em

S. cerevisiae e *E. coli*, o qual conferiu uma respiração resistente a cianeto e sensível a BHAM. *S. cerevisiae* expressando oxidase alternativa mostraram uma menor taxa de multiplicação celular e diminuição na geração de EROs. Nós também observamos que inibidores da cadeia transportadora de elétrons retardaram a transição de micélio para levedura em culturas de *P. brasiliensis*. Além disso, estes inibidores e outras drogas geradoras de EROs aumentaram a expressão do gene da oxidase alternativa, assim como a produção de EROs em leveduras de *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: 1. *Paracoccidioides brasiliensis*.
2. Bioenergética. 3. Vias mitocondriais alternativas.
4. Expressão heteróloga.

Abstract

MARTINS, V.P. **Bioenergetic characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form: biochemical and molecular studies of mitochondrial alternative pathways.** 2007. 210 F. Thesis (Doctoral)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Paracoccidioides brasiliensis, a thermically dimorphic fungus, is the etiological agent of endemic paracoccidioidomycosis, one of the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. Components of the respiratory chain constitute potential pharmacological targets, and here are reported differences between the respiratory chain of the mammalian host and the fungus *P. brasiliensis*. Respiration, membrane potential and oxidative phosphorylation of mitochondria from *P. brasiliensis* spheroplasts were evaluated *in situ*, which demonstrated the existence of a functional respiratory chain. Adenosine 5'-diphosphate (ADP) induced a transition from resting to phosphorylating respiration in mitochondria energized by succinate, NADH, NAD⁺ and complex I linked substrates. The presence of an alternative NADH-ubiquinone oxidoreductase was indicated by: the ability of the fungus to oxidize exogenous NADH; the insensitivity substrate-supported respiration to rotenone and sensitivity of this respiration to flavone. In addition, the sensitivity of NAD⁺-supported respiration to rotenone and flavone suggest that cytosolic pathways contribute to NADH and complex I linked substrates production. Moreover, it was demonstrated that expression levels of complex I and alternative NADH dehydrogenase change during *P. brasiliensis* growth curve. The partial sensitivity of NADH or succinate-supported respiration to antimycin A and cyanide, as well as the sensitivity to BHAM, indicates the presence of an alternative oxidase. Therefore, to characterize the alternative oxidase its gene was cloned and heterologously

expressed in *S. cerevisiae* and *E. coli*, which conferred, a cyanide resistant respiration and BHAM sensitivity. Moreover, *S. cerevisiae* that expressed alternative oxidase showed slower growth rate and decreased ROS generation. We also observed that electron transport pathways inhibitors delayed the *P. brasiliensis* mycelium to yeast transition in cultures. Besides, these inhibitors and other ROS generated drugs increase the ROS production and alternative oxidase expression.

Key words: 1. *Paracoccidioides brasiliensis*, 2. Bioenergetic, 3. Mitochondrial alternative pathways, 4. Heterologous expressi

1- Introdução

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1- Aspectos gerais

Nas duas últimas décadas, infecções oportunistas causadas por fungos têm sido freqüentemente diagnosticadas em pacientes imunocomprometidos, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes hospitalizados em todo o mundo. Com o rápido aumento dos casos de AIDS, a incidência de algumas micoses aumentou dramaticamente, sendo a candidíase a principal infecção oportunista (BECK-SAGUE & JARWIS, 1993; HAZEN, 1995; REES et al., 1998). No entanto, novas espécies de fungos são regularmente identificadas como causadoras de doenças nesses pacientes. Dentre esses patógenos emergentes são importantes causadores de micoses sistêmicas o fungo *Aspergillus fumigatus* como a segunda espécie mais notificada em pacientes imunossuprimidos, em função de transplantes de medula óssea ou de outros órgãos (WANKE et al., 2000), e *Paracoccidioides brasiliensis* causador de uma micose sistêmica endêmica com elevada incidência no Brasil (BENARD & DUARTE, 2000; PANIAGO et al., 2005, MARTINEZ & CASTRO, 2006).

1.2- *Paracoccidioides brasiliensis*

P. brasiliensis é o agente etiológico da micose sistêmica conhecida como Paracoccidioidomicose. Geograficamente, essa doença é restrita à América do Sul e América Central, sendo distribuída heterogeneamente através da América Latina. O maior número de casos tem sido descritos no Brasil, Colômbia e

Venezuela (BETHLEM et al., 1991; RESTREPO, 1985; RESTREPO et al., 2001).

1.2.1- Características macro e microscópicas

P. brasiliensis é um fungo dimórfico encontrado somente na forma assexuada. A forma de levedura cresce em tecidos hospedeiros ou em laboratório quando é cultivado a 37°C. A forma micelial cresce após 20-30 dias de incubação quando o fungo é cultivado a 25°C. As colônias na forma micelial são pequenas, irregulares, de cor branca e coberta por um micélio aéreo, que adere ao ágar quebrando a superfície (LACAZ et al., 1991). A micromorfologia da forma miceliana em ágar Sabouraud revela hifas septadas, com artrosporos, clamidósporos intercalares e aluriosporos globosos (LACAZ et al., 1991).

Na forma de levedura as colônias são macias, a superfície de aspecto enrugado, apresentam cor creme e crescem após 10-15 dias de incubação. As colônias são compostas de células de diferentes tamanhos (entre 4-30 μm). Estas células são ovais ou alongadas com uma fina parede celular e no citoplasma pode ser observada a presença de gotas de lipídios (LACAZ et al., 1991; BRUMMER et al., 1993). A principal característica da forma de levedura é o aparecimento de múltiplos brotamentos em torno da célula mãe, nos quais são baseados os diagnósticos de cultura e histológicos (ANGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971).

As células leveduriformes de *P. brasiliensis* apresentam uma parede celular fina formada por duas subcamadas. Na membrana plasmática encontram-se múltiplas invaginações, as quais compõem vesículas e estruturas tubulares. No citoplasma pode ser encontrado um grande número de mitocôndrias, múltiplos núcleos, além de numerosos vacúolos de diferentes tamanhos e formas, alguns contendo grande quantidade de material elétron-denso (KASHINO et al., 1987).

1.2.2- Patogênese

Embora seja aceito que o ambiente do fungo *P. brasiliensis* seja exógeno aos seres humanos, o exato nicho ecológico, bem como a sua patogênese permanecem desconhecidos. Entretanto, acredita-se que o fungo sobreviva saprofiticamente em solos úmidos e locais ricos em matéria orgânica com mínimas alterações de temperatura, onde o fungo poderia crescer sob forma micelial produzindo conídios (BRUMMER et al., 1993; JANUÁRIO et al., 1999).

Estudos analisando polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) de diferentes cepas de *P. brasiliensis* têm sido realizados com o intuito de se identificar regiões geograficamente restritas de prevalência deste fungo. As análises dos padrões de RFLP de 32 isolados sugerem que pelo menos 5 grupos de cepas, geograficamente distintas, existam em diferentes países dentre eles o Brasil (NIÑO-VEGA et al., 2000).

Estudos realizados com o intuito de se caracterizar melhor a patogênese da Paracoccidioidomicose, mostraram que durante a infecção oral de ratos com conídios de *P. brasiliensis*, esta via de infecção traumática intra-oral não mimetiza o padrão de disseminação da doença em humanos (RÓLDAN et al., 2000). Estas evidências sugerem que a infecção oral não é a principal via de transmissão do fungo.

Por outro lado, animais experimentais ao serem infectados por inalação de conídios, estes se propagaram para a porção distal dos pulmões, onde se transformam na forma de leveduras, multiplicando-se no parênquima e produzindo uma doença progressiva que se disseminou para órgãos extra-pulmonares (McEWEN et al., 1987). Apesar de não estar estabelecida a transmissão da doença, é provável que a contaminação dos seres humanos ocorra de forma semelhante (McEWEN et al., 1987).

Muitos fungos que causam micoses invasivas, como o *P. brasiliensis*, invadem as células epiteliais do hospedeiro durante infecções pulmonares ou de mucosas (FILLER & SHEPPARD, 2006).

Existem duas formas distintas da doença, a forma aguda e subaguda, ou do tipo juvenil e a forma crônica, ou do tipo adulta. Elas dependem da evolução e localização das lesões, as quais podem apresentar desenvolvimento uni ou multifocal (FRANCO, 1987). Em ambos os casos ocorrem uma alta mortalidade na ausência de terapia específica e as lesões mesmo quando

tratadas podem permanecer como seqüelas (forma residual) ou ocorrer uma reincidência que geralmente é acompanhada de significativa fibrose pulmonar (BRUMMER et al., 1993).

Desde a descoberta da AIDS inúmeros casos de paracoccidioidomicose em pacientes aidéticos têm sido descritos (GOLDANI et al., 1989; PEDRO et al., 1989; GOLDANI et al., 1991; PANIAGO et al., 2005, MARTINEZ & CASTRO, 2006). Assim, tem sido recomendado que em países endêmicos a paracoccidioidomicose seja incluída na lista de infecções oportunistas (SAN-BLAS, 1993).

1.3 Função mitocondrial

Através de estudos ultra-estruturais foi demonstrada a presença de inúmeras mitocôndrias em células de *P. brasiliensis* (KASHINO et al., 1987). Estudos histoquímicos em extratos de células revelaram a presença de enzimas da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico, da succinato desidrogenase e da NADH desidrogenase (CARBONELL & KANETSUNA, 1966; KANETSUNA & CARBONELL, 1966). Mitocôndrias são organelas essenciais ao desenvolvimento, diferenciação e divisão de células eucarióticas, dentre estas, fungos filamentosos e leveduras (WESTERMANN et al., 2002). Essas organelas são extremamente dinâmicas movendo-se ao longo do citoesqueleto e exercendo importantes funções na adaptação aos requerimentos energéticos, na divisão e fusão celular, além do seu papel na

transmissão de herança genética às células filhas (WESTERMANN et al., 2002).

A mitocôndria é responsável pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células, através da fosforilação oxidativa (HATEFI, 1985). Na mitocôndria ocorre a interconversão da energia redox livre proveniente da oxidação dos substratos respiratórios em energia química na forma de ATP (MITCHELL, 1961). Os estudos iniciais sobre os mecanismos de interconversão de energia pelas mitocôndrias foram desenvolvidos por KEILIN (1925) ao observar que o sistema responsável era formado por citocromos e por WARBURG (1930) isolando e identificando as desidrogenases, flavoproteínas e algumas coenzimas envolvidas no processo. ENGELHARDT (1930) observou que a fosforilação oxidativa estava associada à respiração de tecidos animais, hipótese confirmada em 1937 com a formulação do ciclo do ácido cítrico por Krebs (KREBS, 1972). Em 1948, Kennedy & Lehninger demonstraram que a fosforilação oxidativa ocorria exclusivamente na fração mitocondrial isolada, e LEHNINGER (1955) demonstrou que o transporte de elétrons a partir do NADH ao oxigênio molecular era a fonte de energia utilizada. Posteriormente, CHANCE & WILLIAMS (1956) desenvolveram o método polarográfico para medir a fosforilação oxidativa, estabelecendo cinco condições, ou estados, que podem controlar a velocidade da respiração nas mitocôndrias. No estado 1, tanto o ADP quanto o substrato

respiratório estão ausentes, o estado 2 é a condição em que o substrato respiratório é o fator limitante da respiração, no estado 3 todos os componentes estão presentes em concentrações adequadas sendo a velocidade de fosforilação do ADP o fator limitante, o estado 4 (basal) é a condição em que a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP, e o estado 5 é caracterizado pela ausência de oxigênio (CHANCE & WILLIAMS, 1956; MORELAND, 1994). A relação entre a respiração de estado 3 e a de estado 4, Razão de Controle Respiratório (RCR), é um parâmetro da função mitocondrial que indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP. A relação ADP/O, um outro parâmetro, está associado com a eficiência da mitocôndria em sintetizar ATP.

Na figura 01 estão ilustrados os principais componentes da cadeia respiratória mitocondrial em mamíferos.

Figura 01- Representação esquemática dos principais componentes da cadeia respiratória e vias mitocondriais envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa em mamíferos. MME- membrana mitocondrial externa; MMI- membrana mitocondrial interna; UQ- Ubiquinona; I, II, III, IV e V- Complexos da cadeia respiratória mitocondrial, Cit c- Citocromo c.

A energização de mitocôndrias com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons (Δp), cujo potencial elétrico de membrana ($\Delta \Psi$) é de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e cuja diferença de pH (ΔpH) é de uma unidade (alcalino na matriz). Assim, $\Delta p = \Delta \Psi + \Delta pH$; a variação de energia livre resultante do movimento de 1 próton para a matriz mitocondrial é de 15 a 20 kJ/mol, suficiente para sintetizar 1 ATP através da fosforilação oxidativa. O sistema responsável pela fosforilação oxidativa, na membrana interna da mitocôndria, é formado por cinco complexos enzimáticos que

incluem a cadeia respiratória (complexos I-IV) e a FoF1-ATP sintase (complexo V). Durante a fosforilação oxidativa os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis pela ação de desidrogenases específicas, ligadas ao NAD^+ (substratos de sítio I), e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. Os equivalentes redutores são transferidos inicialmente a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). Em outra via, o succinato é oxidado pela succinato desidrogenase ligada ao FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem os seus elétrons a ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos seqüencialmente aos complexos III, citocromo c, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água. Os elétrons originados na beta oxidação dos ácidos graxos também são transferidos à cadeia respiratória através da ubiquinona (BOYER et al., 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER et al., 1993).

De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV são acompanhados de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

Apesar dos processos metabólicos mitocondriais serem conservados dentre a maioria das células eucarióticas, vários organismos eucarióticos podem apresentar vias e mecanismos alternativos de obtenção de energia, principalmente em plantas e fungos.

1.4- Componentes mitocondriais alternativos

Uma importante característica em mitocôndrias de plantas (RASMUSSEN et al., 1999) e fungos (DE VRIES et al., 1988; MELO et al., 2001), é a presença de enzimas alternativas, como a proteína desacopladora (UCP), a oxidase alternativa (AOX) e a NADH desidrogenase alternativa (Ndh).

Proteínas desacopladoras foram descritas em várias espécies de plantas como *Solanum tuberosum* (JEZEK, COSTA & VERCESI, 1996), *Arabidopsis thaliana* (MAIA et al., 1998) e *Lycopersicon esculentum* (COSTA et al., 1999); em fungos como *Candida parapsilosis* (JARMUSZKIEWICZ, et al., 2000), *Aspergillus fumigatus* (TUDELLA et al. 2004), e *Candida albicans* (CAVALHEIRO et al., 2004).

A oxidase alternativa é encontrada na mitocôndria de todas as plantas, bem como em alguns fungos e protozoários (BERTHOLD et al., 2000). STENMARK & NORDLUND (2003) descreveram pela primeira vez a presença de uma oxidase alternativa em procariotos, *Novosphingobium aromaticivorans*.

Diferentes conjuntos de NADH desidrogenases alternativas estão presentes em várias plantas (RASMUSSEN et al., 1999;

KERSCHER, 2000), fungos (DE VRIES et al., 1988; MELO et al., 2001), eubactérias (BJÖRKLOF et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2001), e arqueobactérias (GOMES et al., 2001; BANDEIRAS et al., 2003).

Pouco se sabe sobre o papel fisiológico destes componentes alternativos, mas estudos sugerem que estejam envolvidos na adaptação destes organismos em ambientes instáveis como estresse provocado pelo frio, estresse oxidativo, condições anaeróbias e variações de temperatura (AMORA et al., 2000; CALEGARIO et al., 2003). A figura 2 ilustra os principais componentes da cadeia respiratória e componentes alternativos em plantas e fungos.

Figura 02- Representação esquemática dos componentes clássicos e alternativos, da cadeia respiratória mitocondrial e vias metabólicas, envolvidos nos processos de fosforilação oxidativa em fungos e plantas. MME- membrana mitocondrial externa; MMI- membrana mitocondrial interna; UQ - Ubiquinona; I, II, III, IV e V- Complexos da cadeia respiratória mitocondrial; Cit c- Citocromo C; Ndh int e Ndh ext- NADH desidrogenases alternativas interna e externa; AOX- Oxidase alternativa; UCP- Proteína desacopladora

1.4.1- NADH desidrogenase alternativa

A atividade da NADH desidrogenase alternativa foi observada pela primeira vez por BONNER & VOSS (1961) os quais demonstraram que a mitocôndria de plantas, ao contrário de mamíferos, era capaz de oxidar o NADH externo à mitocôndria. Esta enzima consiste de uma simples cadeia polipeptídica, sem domínio transmembrana evidente e contém uma molécula de FAD, (co-fator de redução) tornando-a capaz de realizar reações de oxido-redução assim como o complexo I mitocondrial.

Entretanto, diferente deste complexo enzimático, a NADH desidrogenase alternativa não contribui para o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. Esta enzima, quando voltada para a matriz mitocondrial, pode competir com o complexo I pelos substratos NADH e ubiquinona (DE VRIES & MARRES, 1987; YAGI, 1991) e é insensível aos inibidores clássicos do complexo I, como rotenona e piericidina A (KERCHER, 2000). Porém, esta enzima pode ser inibida por alguns compostos, incluindo os flavonóides (OETTMEIER et al., 1994) e o 1-Hydroxy-2-dodecil-4(1H)quinolona (HDQ) (ESCHEMANN et al., 2004). Estudos realizados em *N. crassa* mostraram que a expressão do complexo I ocorre antes da fase exponencial e durante a fase estacionária, enquanto, durante a fase exponencial são observados altos níveis de NADH desidrogenase alternativa no lugar do complexo I (SCHWITZGUÉBEL & PALMER, 1982).

Em *S. cerevisiae* são conhecidas três NADH desidrogenases alternativas, sendo duas externas, SCNDE1 e SCNDE2 (LUTTIK et al., 1998; SMALL & MACALISTER-HENN, 1998) e uma interna, SCNDI1 (MARRES et al., 1991; DE VRIES et al., 1992). Estas 3 enzimas são as únicas formas de oxidação de NADH acoplada à cadeia respiratória, nesta levedura, uma vez que o *S. cerevisiae* não possui complexo I mitocondrial (FRIEDRICH et al., 1995).

1.4.2- Oxidase alternativa

A mitocôndria de todos os eucariotos conhecidos possui a citocromo c oxidase, um componente terminal da cadeia respiratória, responsável pela reação em que os elétrons resultantes da oxidação do substrato pelas desidrogenases são transferidos para o oxigênio molecular reduzindo-o a água. Alguns organismos contêm uma segunda oxidase que também catalisa a transferência de quatro elétrons e a redução do oxigênio à água. O fluxo de elétrons desta via alternativa ramifica-se da via de transferência de elétrons convencional (frequentemente referida como via da citocromo oxidase) através da ubiquinona (SIEDOW & UMBACH, 2000). A transferência de elétrons através da oxidase alternativa não está acoplada ao bombeamento de prótons, desta forma dois (complexos III e IV) dos três sítios de conservação de energia são desviados e a energia livre liberada é dissipada como calor. Essa oxidase alternativa é resistente a inibidores do complexo III (mixotiazol e antimicina A) e IV (cianeto) da cadeia respiratória, mas pode ser inibida especificamente por alguns compostos incluindo o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o *N*-propil galato (MOORE et al., 1991; SIEDOW et al., 1995).

Muito pouco é conhecido sobre a bioenergética mitocondrial em *P. brasiliensis*, entretanto, MEDOFF et al. (1987) relataram a presença de uma oxidase alternativa neste fungo e GOLDMAN et al. (2003) descreveram o gene *aoxPb* e analisaram a expressão desse gene durante a conversão de forma do fungo. Em

outros fungos patogênicos como *A. fumigatus*, estudos de respiração realizados *in situ* em nosso laboratório, também indicaram a presença de uma oxidase alternativa (TUDELLA et al., 2003).

Em fungos a oxidase alternativa é uma proteína monomérica de aproximadamente 32 kDa com cerca de 250 a 300 aminoácidos sendo classificada como uma proteína do subgrupo “di-iron”, semelhante à subunidade R_2 das ribonucleotídeo redutases (SIEDOW & UMBACH, 2000). Atualmente, são propostos dois modelos estruturais para a oxidase alternativa (AFFOURTIT et al., 2002). O primeiro propõe a existência de duas α -hélices hidrofílicas transmembrana, conectadas por outra α -hélice hidrofóbica inserida na membrana mitocondrial interna (SIEDOW et al., 1995 e MOORE et al., 1995). O segundo modelo propõe uma disposição interfacial, ao invés da conformação transmembrana, com as duas α -hélices hidrofílicas voltadas para a matriz mitocondrial (ANDERSSON et al., 1999; BERTHOLD et al., 2000).

Embora o significado fisiológico da via alternativa em muitos casos permaneça desconhecido, em algumas plantas sua função está associada à florescência, na qual a alta taxa de respiração através desta via libera calor resultando na volatilização de compostos que atraem insetos polinizadores (MEEUSE, 1975; RASKIN et al., 1987). Em plantas a variação de fatores externos como baixas temperaturas e infecções por

patógenos também podem influenciar a expressão do gene da oxidase alternativa e sua atividade enzimática (VANLERBERGHE et al., 1997).

Vários autores têm relatado em outros organismos como fungos e protozoários, a participação da via da oxidase alternativa em diferentes processos metabólicos.

Em *A. niger* a contribuição da via alternativa para a produção de ácido cítrico foi observada como um sistema reoxidativo de NADH sem a formação de ATP, mantendo a atividade do metabolismo de glicose e conseqüentemente induzindo a produção de uma grande quantidade de ácido cítrico (KIRIMURA et al., 2000). Em *Trypanosoma brucei brucei* NIHEI et al. (2002) e NIHEI et al. (2003), através da inibição da atividade enzimática, demonstraram a participação essencial da oxidase alternativa em determinadas fases de diferenciação deste protozoário.

A utilização de inibidores da cadeia respiratória mitocondrial é uma abordagem clássica em experimentos envolvendo a atividade e a expressão gênica da oxidase alternativa. Alguns inibidores da via respiratória da citocromo oxidase tem mostrado uma indução na transcrição do gene da oxidase alternativa em fungos (SAKAJO et al., 1991) e plantas (VANLERBERGHE et al., 1997) aumentando os níveis de síntese da enzima. Resultados como este tem reforçado a idéia de que uma das funções da oxidase alternativa seja a manutenção do fluxo respiratório quando o metabolismo

respiratório normal é perturbado por alguma razão ou caso a via normal de transferência de elétrons esteja saturada (MOORE et al., 1991). Alguns autores expandem esse conceito, sugerindo que a principal função da via alternativa seja a manutenção da concentração de ubiquinona suficientemente oxidada prevenindo a autooxidação da ubiquinona reduzida e a subsequente formação de espécies reativas de oxigênio (WAGNER et al., 1997).

1.5- Relação entre vias mitocondriais clássicas e alternativas com a geração de EROs

Há uma taxa de dano oxidativo basal em todas as células que utilizam processos oxidativos para obtenção de energia (SCANDALIOS, 1993). As mitocôndrias são as principais produtoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HARMAN, 1956, 1981, 1998; NOGUEIRA et al., 2001). O aumento na formação de EROs é proporcional às lesões celulares e morte celular, contribuindo decisivamente nos processos de necrose e apoptose celular (SKULACHEV, 2006; LEMASTER, 2006). Durante a respiração em animais é estimado que superóxido seja gerado de 1-2% de todo o fluxo de elétrons transportados pela cadeia respiratória (BOVERIS & CHANCE, 1973; LIU, 1997), sendo o complexo I mitocondrial e a concentração de semiquinona reativa os principais causadores desse processo (GALKIN & BRANDT, 2005).

É descrito que a inibição ou a saturação da cadeia respiratória em qualquer um dos 4 complexos leva ao aumento

dos danos oxidativos à célula (VERCESI et al., 1997; BRAIDOT et al. 1999). Esses danos podem gerar alterações de funções mitocondriais e/ou celulares levando à morte celular. São conhecidas várias substâncias biológicas e sintéticas que exercem atividade microbicida ou herbicida inibindo funções mitocondriais.

HELMERHOST et al. (2001) demonstraram que a atividade fungicida do peptídeo salivar (histatina 5), componente do sistema de resposta não imunológico, ocorre pela inibição da cadeia respiratória mitocondrial e subsequente aumento na geração de EROs. Outro importante agente microbicida é o óxido nítrico (NO) produzido durante a resposta imunológica por células fagocíticas. O complexo IV mitocondrial é inibido por concentrações nanomolares de óxido nítrico (BROWN, 1995 e 1999). Enquanto o complexo I é inibido por concentrações micromolares (ORSI, et al., 2000). No entanto, a atividade da oxidase alternativa não é afetada por NO (WAINIO, 1955; MILLAR & DAY, 1996).

Dessa forma a presença da oxidase alternativa em combinação com uma NADH desidrogenase interna ou externa manteria a oxidação de NADH e o fluxo de elétrons, mesmo na presença de NO, prevenindo o acúmulo de semiquinona e a subsequente geração de EROs (JOSEPH-HORNE et al., 2001). Esses componentes alternativos funcionariam, então, como uma forma de resistência a condições de estresse oxidativo. Portanto, a

inibição dessas vias alternativas poderia ser utilizada como potencial alvo quimioterápico.

1.6- Potencial quimioterapêutico da oxidase e NADH desidrogenase alternativas

Sistemas metabólicos de fungos são alvos atrativos para a quimioterapia, devido ao papel essencial destes na sobrevivência e adaptação dos patógenos em ambientes hostis como anaerobiose ou estresse oxidativo. Outro fator de importância quimioterapêutica é a diferença entre os sistemas metabólicos dos fungos e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003).

Oxidases terminais insensíveis à inibição por cianeto como a oxidase alternativa, assim como NADH desidrogenases alternativas são alvos importantes no desenvolvimento racional de quimioterápicos, pois essas enzimas não estão presentes em hospedeiros mamíferos (MELO et al., 2004). Os principais compostos que agem bloqueando as ações da oxidase alternativa possuem estruturas similares a ubiquinona (MINAGAWA et al., 1997). NIHEI et al. (2002) e NIHEI et al. (2003) verificaram a inibição de crescimento de *T. brucei brucei* *in vitro* e *in vivo* utilizando ascofuranona, um inibidor específico da oxidase alternativa de *T. brucei brucei*, CLARKSON et al. (1981) também observaram uma inibição de crescimento de *T. brucei brucei* promovida pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Nesses casos, a oxidase alternativa era essencial em alguma fase de

diferenciação do parasita, pois a sua inibição foi suficiente para comprometer o desenvolvimento do microrganismo (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003).

No entanto, mesmo quando estas enzimas alternativas não sejam essenciais para o desenvolvimento do patógeno, a ação preventiva exercida por elas na formação de EROs na mitocôndria (WAGNER et al., 1997; MAXWELL et al., 1999; DUFOUR et al., 2000; JOSEPH-HORNE et al., 2001) poderiam agir como um fator de resistência a quimioterápicos, quando o mecanismo de ação destas drogas consistir em aumentar radicais livres através do bloqueio ou desacoplamento do processo de fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial.

Nos últimos anos vários trabalhos descreveram a participação de vias mitocondriais alternativas em processos de resistência a drogas e ao estresse oxidativo induzido. BIAGINAI et al., (2006) demonstraram que a inibição da NADH desidrogenase alternativa externa em *Plasmodium falciparum* levou o parasita à morte pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial. NITLLER et al., (2005) demonstraram o aumento de expressão dos genes da NADH desidrogenase alternativa e da oxidase alternativa em *Histoplasma capsulatum* após o tratamento com drogas liberadoras de NO. WOOD & HOLLOMON (2003) relatam o papel de vias mitocondriais alternativas na resistência a drogas antifúngicas. MURPHY & LANG-UNNASCH (1999) demonstraram que a inibição da enzima oxidase alternativa aumenta a atividade da droga atovaquona contra

Plasmodium falciparum. Estudos em mutantes de *Podospora anserina* com deficiência em subunidades da citocromo oxidase demonstraram uma indução na expressão do gene de oxidase alternativa (PaAox) e subseqüentemente, uma diminuição na geração de EROs (OSIEWACZ, 2002). JOHNSON et al. (2003) demonstraram um aumento de transcrição do gene de uma oxidase alternativa em *Histoplasma capsulatum* após um estresse oxidativo mediado por peróxido de hidrogênio ou por inibição do transporte de elétrons com antimicina A ou cianeto de sódio.

Vários grupos de pesquisa têm estudado organismos apresentando respiração resistente a cianeto (presença de uma oxidase alternativa), mesmo assim o papel desta via em leveduras ainda não foi esclarecido. VEIGA et al. (2003) relatam que a expressão heteróloga da oxidase alternativa em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* consiste em uma abordagem promissora para a caracterização cinética e energética desta enzima, podendo fornecer um melhor entendimento dessa via alternativa.

Dessa forma, os estudos moleculares envolvendo a clonagem e expressão da oxidase alternativa, assim como de outras enzimas mitocondriais alternativas, podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de regulação e funções dessas vias alternativas em fungos dimórficos como *P. brasiliensis*, além de fornecer bases para o desenvolvimento de novos agentes inibidores.

2- Objetivos

2- OBJETIVOS

Muito pouco é conhecido sobre a bioenergética mitocondrial do fungo *P. brasiliensis*, dessa forma, nossos principais objetivos foram:

- Caracterização da bioenergética mitocondrial da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, *in situ*;
- Caracterização bioquímica e molecular da oxidase alternativa de *P. brasiliensis*.

3- Material e Métodos

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções e tampões

3.1.1 Tampão de pré-incubação para esferoplastos de *P. brasiliensis*

Sacarose	0,7 mol/L
DTT	30,0 mmol/L
Tris-HCl pH 6,5	100,0 mmol/L

3.1.2 Tampão de digestão para esferoplastos de *P. brasiliensis*

Sacarose	0,7 mol/L
Tris-HCl pH 6,5	50,0 mmol/L

3.1.3 Tampão de respiração para esferoplastos de *P. brasiliensis*

Sacarose	0,7 mol/L
EGTA	0,5 mmol/L
KCl	1,7 mmol/L
MgCl ₂	5,0 mmol/L
KH ₂ PO ₄ pH 6,8	10,0 mmol/L

3.1.4 Tampão para titulação de potencial de membrana

Sacarose	0,7 mol/L
EGTA	0,5 mmol/L
NaCl	1,7 mmol/L

MgCl ₂	5,0 mmol/L
NaH ₂ PO ₄ pH 6,8.....	10,0 mmol/L

3.1.5 Salina fosfato tamponada (PBS)

NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
ÁGUA DESTILADA Q.S.P.....	1000,00 mL

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.6 Tampão de Extração de DNA

Triton X-100.....	2% (p/v)
SDS.....	1% (p/v)
NaCl.....	100 mmol/L
EDTA.....	75 mmol/L
Tris-HCl pH 8,0.....	10 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.7 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA.....	10 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0.....	40 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.8 Tampão Tris-EDTA (TE) 1X

EDTA.....	1 mmol/L
Tris-HCl pH 7,5.....	10 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.9 Tampão de carregamento de DNA em gel de agarose

EDTA.....	10,00 mmol/L
Tris-HCl pH 7,5.....	10,00 mmol/L
Azul de bromofenol.....	0,25% (p/v)
Xileno cianol FF.....	0,25% (p/v)
Orange G.....	0,25% (p/v)

Sacarose.....	0,65% (p/v)
---------------	-------------

3.1.10 RF1

KCl.....	100 mmol/L
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	50 mmol/L
KAc pH 6,9.....	30 mmol/L
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	10 mmol/L
Glicerol.....	15% v/v
H ₂ O deionizada q.s.p.....	500mL

O pH da solução final foi ajustado para pH 5,8 com ácido acético (HAc) e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

3.1.11 RF2

Na-MOPS pH 7,0.....	10 mmol/L
KCl.....	10 mmol/L
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	75 mmol/L
Glicerol.....	15% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	500 mL

O pH da solução final foi ajustado para pH 6,8 com NaOH e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

3.1.12 Tampão para lise de *E. coli* e extração de plasmídeos

EDTA.....	10 mmol/L
Tris-HCl pH 8,0.....	25 mmol/L
Glucose.....	50 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.13 Tampão de lise 1

NaCl.....	300 mmol/L
NaH ₂ PO ₄ pH 8,0.....	50 mmol/L
Imidazol.....	5 mmol/L

3.1.14 Acetato de Lítio 1X

Acetato de Lítio pH 7,5.....	100 mmol/L
------------------------------	------------

O reagente foi dissolvido em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. Em seguida a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e Kgf/cm² por 20 minutos.

**3.1.15 Tampão de pré-incubação para esferoplastos de
*S. cerevisiae***

β -mercaptoetanol.....	100 mmol/L
Tris-HCl pH 8,5.....	10 mmol/L

**3.1.16 Tampão de digestão para esferoplastos de
*S. cerevisiae***

Sorbitol.....	1,3 mol/L
EDTA.....	0,5 mmol/L
BSA.....	0,2% (p/v)
Imidazol-HCl pH 6,4.....	10,0 mmol/L

**3.1.17 Tampão de lise-1 para esferoplastos de
*S. cerevisiae***

Sorbitol.....	300,0 mmol/L
EGTA.....	0,5 mmol/L
BSA.....	0,2% (p/v)
Imidazol-HCl pH 6,4.....	10,0 mmol/L

**3.1.18 Tampão de lise-2 para esferoplastos de
*S. cerevisiae***

Sorbitol.....	1,0 mol/L
EGTA.....	0,5 mmol/L
BSA.....	0,2% (p/v)

Imidazol-HCl pH 6,4.....	10,0 mmol/L
--------------------------	-------------

3.1.19 Tampão de mitocôndria para *S. cerevisiae*

Manitol.....	0,6 mol/L
EGTA.....	0,5 mmol/L
Imidazol-HCl pH 6,4.....	10,0 mmol/L

3.1.20 Tampão de lise para levedura

EDTA.....	1 mmol/L
Tampão fosfato pH 7,4.....	50 mmol/L
Glicerol.....	5% (v/v)
PMSF.....	1 mmol/L

3.1.21 Preparo de géis para SDS-PAGE

Gel de empacotamento 5%

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5/1 (Bio-Rad)	170 µL
Tris-HCl 1,0 mol/L pH 6,8.....	130 µL
SDS 10% (p/v).....	10 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	10 µL
TEMED (Bio-Rad).....	1 µL
H ₂ O deionizada.....	680 µL
Volume final de gel.....	1.000 µL

Gel de corrida 12%

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5/1 (Bio-Rad)	1.600,0 µL
Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8.....	1.040,0 µL
SDS 10% (p/v).....	40,0 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	40,0 µL
TEMED (Bio-Rad).....	1,6 µL
H ₂ O deionizada.....	1.280,0 µL
Volume final de gel.....	4.000,0 µL

3.1.22 Tampão de amostra 2X concentrado

DTT.....	100,000 mmol/L
Tris-HCl pH 6,8.....	80,000 mmol/L
Glicerol.....	15,000% (v/v)
SDS.....	2,000% (p/v)
Azul de bromofenol.....	0,006% (p/v)

3.1.23 Tampão de corrida Tris/Glicina

Tris-HCl pH 8,3.....	25,0 mmol/L
Glicina.....	250,0 mmol/L
SDS.....	0,1% (p/v)

3.1.24 Solução corante de Comassie

Comassie (Brilhant Blue G).....	0,25% (p/v)
Metanol.....	50,00% (v/v)
Ácido acético.....	7,00% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	500,00 mL

3.1.25 Solução descolorante

Etanol.....	5% (v/v)
Ácido acético.....	7% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000 mL

3.1.26 Tampão de transferência (Western Blotting)

Tris-HCl pH 8,3.....	25,00 mmol/L
Glicina.....	192,00 mmol/L
Metanol.....	20,00% (v/v)
SDS.....	0,05% (p/v)
H ₂ O deionizada qsp.....	1.000,00 mL

3.1.27 TBS-T

Tris-HCl 1 M pH 7,6	20,0 mL
NaCl.....	8,0 g
Tween 20.....	0,1% (v/v)
H ₂ O deionizada qsp.....	1.000,0 mL

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 FAVA-NETO

Proteose peptona nº3 (Difco)	3 g
Peptona (Oxoid)	10 g
Extrato de carne (Oxoid)	5 g
NaCl	5 g
Extrato de levedura (Oxoid)	5 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
Água destilada qsp	1.000 mL

As substâncias que compõem este meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. Em seguida foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

A quantidade necessária de dextrose foi adicionada a partir de uma solução estoque 40% (p/v) (esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm). Em seguida, o meio foi distribuído em tubos estéreis os quais foram mantidos inclinados sob temperatura ambiente até solidificação. O meio FAVA-NETO também foi utilizado na forma líquida, sem adição de Agar a mistura.

3.2.2 Sabouraud Dextrose Agar

Neopeptona (DIFCO)	10 g
Bacto-Dextrose (DIFCO)	40 g
Bacto-Agar (DIFCO)	15 g
Água destilada qsp (DIFCO)	1.000 mL

Este meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1Kg_f/cm² por 20 minutos. Em seguida, o meio foi distribuído em tubos estéreis os quais foram mantidos inclinados sob temperatura ambiente até solidificação.

3.2.3 PGY

Peptona (Oxoid)	5 g
Extrato de levedura (Oxoid)	5 g
Dextrose	10 g
Água destilada qsp	1.000 mL

Este meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kg_f/cm² por 20 minutos. Quando necessário foi adicionado 15 g de Agar para preparo do meio sólido.

3.2.4 LB (Lúria Bertani)

Bactotriptonas.....	10 g
Extrato de Levedura.....	5 g

NaCl.....	10 g
Ágar.....	18 g
Água.....	1000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5; quando necessário foi adicionado Agar para preparo do meio sólido. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.5 SOB

bactotripton.....	2% (p/v)
extrato de levedura.....	0,5% (p/v)
NaCl.....	10 mmol/L
KCl.....	2,5 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
MgSO ₄	10 mmol/L
H ₂ O destilada q.s.p.....	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado entre 6,8 - 7,0 e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.6 SOC

O meio SOC é idêntico ao meio SOB, adicionado de glucose em concentração final de 20 mmol/L (esterilizada em membrana de 0,22 μ m). A solução de glucose é adicionada ao meio SOB após este ter sido esterilizado como descrito no item 3.2.6.

3.2.7 YPD

Peptona (Oxoid)	20 g
Extrato de levedura (Oxoid)	10 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
Água destilada qsp	1.000 mL

Este meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Em seguida foi adicionado ao meio 100 mL de uma solução estoque estéril de Dextrose 20% (p/v) e distribuído em placas de vidro estéreis.

3.2.8 SC (meio mínimo)

Base de nitrogênio para levedura (Difco™)	0,670% (p/v)
Fonte de carbono:	
(ou) Glucose	2,000% (p/v)
(ou) Rafinose	2,000% (pv)
(ou) Galactose	2,000% (p/v)

adenina, arginina, cisteína,	}	0,010% (p/v)
leucina, lisina, treonina,		
triptofano e uracila		
ácido aspártico, histidina,	}	0,005% (p/v)
isoleucina, metionina, prolina,		
fenilalanina, serina, tirosina e		
valina		
Agar.....		2,000% (p/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....		1.000,000 mL

O meio SC é definido como um meio de cultura mínimo para leveduras, em sua preparação foram dissolvidos os reagentes em 900 mL de água deionizada (800 mL se for preparar o meio contendo rafinose como fonte de carbono), o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Em seguida dependendo da fonte de carbono utilizada foi adicionada uma solução estoque estéril de dextrose ou rafinose para uma concentração final de 2% (p/v). Por fim esse meio foi distribuído em placas de vidro estéreis. No preparo do meio SC líquido não se adicionou Agar.

Para o meio SC seletivo foi omitido do meio o reagente Uracila.

No preparo do meio SC para indução de expressão segue-se os mesmos passos anteriores, no entanto, é adicionada uma solução estéril de galactose para uma concentração final de 2% (p/v).

Para o preparo do meio SC não fermentativo são utilizados como fonte de carbono, galactose 0,05% (p/v), glicerol 1,0% (v/v) e etanol 2,0% (v/v).

As soluções estoque de glucose, rafinose, galactose, glicerol e etanol foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μ m.

3.3 Organismos

3.3.1 *Paracoccidioides brasiliensis*

A cepa 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, na forma de micélio, foi obtida da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo). Estas cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud, um meio básico utilizado por LUTZ (1908) e SPLENDORE (1912) para o isolamento desse fungo à temperatura ambiente. Para obtenção da forma leveduriforme, o fungo foi cultivado a 37°C, em meio FAVA NETO (FAVA-NETO, 1961).

Para a produção de esferoplastos a cepa 18 foi cultivada em meio PGY a 35,5°C segundo SAN-BLAS et al., (1994).

3.3.2 *E. coli*

Tabela 01- Linhagens de *E. coli* e seus genótipos.

linhagem	genótipo
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA</i> <i>endA</i> <i>gyrA96t</i> <i>hi-1</i> <i>relA1</i>
XL1-Blue	<i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>recA</i> <i>endA</i> <i>gyrA46t</i> <i>hi</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> ⁻ F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15 Tn10 (<i>tet</i> ^r)]
Rosetta (DE3) pLysS TM	pLysS F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> (DE3) pLysSRARE (Cm ^R)

As bactérias *E. coli* das linhagens DH5 α e XL1-Blue foram utilizadas como receptoras para transformação, clonagem e propagação de plasmídeos.

A linhagem de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysSTM foi utilizada para a expressão do gene *aoxPb*.

3.3.3	<i>S. cerevisiae</i>
-------	-----------------------------

A cepa de *S. cerevisiae* da linhagem INVSc1 genótipo: MATa *his3* Δ 1 *leu2* *trp1-289* *ura3-52*/ MAT α *his3* Δ 1 *leu2* *trp1-289* *ura3-52* e fenótipo auxotrófico: His⁻, Leu⁻, Trp⁻, Ura⁻ foram utilizadas para a expressão do gene *aoxPb*.

3.4 Teste de viabilidade de células fúngicas

Os testes de viabilidade foram realizados conforme descrito por CALICH et al., (1978). Foram preparadas soluções estoques de diacetato de fluoresceína 5,0 mg/mL em acetona e brometo de etídeo 1,0 mg/mL em salina fosfato tamponada (PBS), pH 7,4 e armazenadas a -20°C. Essas soluções foram diluídas em PBS para concentração final de 2 µg/mL para o diacetato de fluoresceína, e 50 µg/mL para o brometo de etídeo. O teste da viabilidade foi avaliado através da fluorescência do diacetato de fluoresceína - brometo de etídeo. Para o teste, volumes iguais das soluções de diacetato de fluoresceína, brometo de etídeo e da suspensão das células fúngicas, foram misturados e incubados por 15 minutos a 37°C. Após essa incubação 50 µL da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula, e observada em um microscópio de fluorescência Axioskop Zeiss equipado com lâmpada de luz ultravioleta, utilizando o filtro 2 (DAPI + DNA) da Zeiss, no laboratório da Prof^a Dr^a Suraia Said do Dep. de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP.

3.5 Produção de esferoplastos de *P. brasiliensis*

Os esferoplastos foram produzidos de acordo com SAN-BLAS et al. (1994), com algumas modificações. Células de *P. brasiliensis* cepa 18 cultivadas por 8 a 10 dias a 35,5°C em 1 tubo com meio PGY sólido foram coletadas com alça de platina

e ressuspensas em 4,0 mL de PGY líquido. Essa suspensão foi agitada brevemente em agitador mecânico para rompimento de aglomerados celulares e em seguida inoculada em 150 mL de meio PGY líquido em frasco de 500 mL tipo “erlenmeyer”, o qual foi incubado sob agitação de 160 rpm em agitador orbital entre 72 e 84 horas a 35,5°C.

Após o cultivo das células em meio líquido elas foram coletadas por centrifugação em rotor tipo “Swing-Bucket” a 2.000 *g* por 8 minutos a temperatura ambiente e lavadas uma vez em 25 mL de tampão PBS pH 7,0; EDTA 50 mmol/L e outra em 15 mL de tampão de pré-incubação para esferoplastos de *P. brasiliensis* (item 3.1.1) sem DTT. Em seguida, as células foram ressuspensas em 6,0 mL de tampão de pré-incubação por grama de células úmidas iniciais e pré-incubadas sob agitação de 90 rpm a 37°C por 1 hora. Seguido a pré-incubação as células foram lavadas uma vez em 15 mL de tampão de pré-incubação e uma vez em 10 mL de tampão de digestão (item 3.1.2) por grama de células, após essas lavagens as células foram ressuspensas em 6 mL de tampão de digestão por grama de células e adicionados 35 mg de enzima Glucanex® (Novozymes). Essa mistura foi incubada sob agitação a 90 rpm por 4,0 horas a 37 °C. A digestão foi monitorada em microscópio ótico pela observação da morfologia das células, ressuspensas em água destilada e em tampão de digestão. Ao longo da digestão da

parede celular as células suspensas em água tornam-se túrgidas tendendo-se à lise.

Após a formação dos esferoplastos as células foram lavadas duas vezes em 15 mL de tampão de digestão gelado, uma vez em 5,0 mL de tampão de respiração gelado (item 3.1.3) e ressuspensas em 1,0 mL de tampão de respiração gelado.

3.6 Medidas de consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio pelos esferoplastos de *P. brasiliensis*, pelas células de *E. coli* e *S. cerevisiae* foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo acoplado a um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middlenton, WI, USA). Os ensaios foram realizados a 30°C em 1,8 mL de meio de respiração, sendo este meio para *P. brasiliensis* tampão de respiração para esferoplastos, para *E. coli* meio LB e para *S. cerevisiae* meio SC. Os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com CHANCE & WILLIAMS (1956), considerando-se a presença de 445 η átomos de oxigênio por mL de solução ou meio de respiração aquosos.

3.7 Potencial de membrana mitocondrial

A diferença de potencial de membrana dos esferoplastos de *P. brasiliensis* foi determinada monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina O (concentração final 10 μ M)

conforme PETRUSSA et al., (1992), em um espectrofluorímetro Hitachi - F4500 usando 495 e 586 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. O meio de reação utilizado foi o tampão de respiração (item 3.1.3) em um volume final de 2 mL a 30°C.

A titulação do potencial de membrana dos esferoplastos de *P. brasiliensis* foi realizada em tampão livre de íons potássio (item 3.1.4). O potencial de membrana foi gerado pela adição de substratos (NADH 2 mM ou succinato 10 mM). A adição de valinomicina, um ionóforo de potássio capaz de colapsar o $\Delta\Psi$ por facilitar o influxo eletrogênico desse cátion, não causou qualquer alteração na fluorescência. Entretanto, a subsequente titulação com potássio foi seguida por um aumento da fluorescência, decorrente da diminuição no $\Delta\Psi$ causada pelo influxo de potássio. A adição de FCCP colapsou completamente o $\Delta\Psi$.

O $\Delta\Psi$ após cada adição de potássio foi calculado através da equação de Nernst:

$$\Delta\Psi = 60 \log \frac{[K^+_{in}]}{[K^+_{ex}]}$$

A concentração de K^+ no interior das mitocôndrias $[K^+_{in}]$ foi considerada 120 mM e a concentração externa $[K^+_{ex}]$ variou em função do KCl adicionado no meio de incubação. Assim, foi estabelecida uma correlação entre os valores de unidade relativa de fluorescência (URF) e $\Delta\Psi$; esta correlação é

possível, uma vez que a fluorescência da safranina O varia linearmente com o potencial de difusão do K^+ para o interior da mitocôndria, mas não responde ao ΔpH . Admite-se que o valor de $\Delta\Psi$ obtido seja aproximado, uma vez que o erro na estimativa da concentração interna de K^+ pode causar uma pequena variação no $\Delta\Psi$, ou seja, de 5 mV para cada alteração de 20 mM na $[K^+]_{in}$ (AKERMAN & WIKSTROM, 1976).

3.8 Curva de crescimento da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*

Células de *P. brasiliensis* cepa 18 cultivadas por 8 a 10 dias a 35,5°C em 1 tubo com meio PGY sólido foram coletadas com alça de platina e ressuspensas em 4,0 mL de PGY líquido. Essa suspensão foi agitada brevemente em agitador mecânico para rompimento de aglomerados celulares e em seguida inoculada em 150 mL de meio PGY líquido em frasco de 500 mL, o qual foi incubado sob agitação de 160 rpm em agitador orbital entre 120 e 144 horas a 35,5°C. As células dessa cultura foram recuperadas por centrifugação e lavadas uma vez em meio PGY novo. A partir dessa cultura, para avaliar a expressão de alguns genes ao longo da fase de crescimento exponencial e estacionária, foram inoculadas 2×10^6 UFC/mL em 6 frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio PGY. Esses frascos foram incubados a 35,5°C sob agitação de 160 rpm sendo que as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas uma vez

em PBS nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 240 horas de crescimento. Foram adicionadas pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) na mesma proporção do volume de células e essa mistura foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -70°C . Após a coleta de todas as amostras foi realizado o isolamento de RNA conforme o item 3.9 e a quantificação da expressão gênica foi determinada por PCR em tempo real.

3.9 Extração de RNA, quantificação e eletroforese

Os RNAs de diferentes culturas foram extraídos pelo método do Trizol[®] (Invitrogen) segundo GOLDMAN et al. (2003). Cerca de 5×10^7 a 1×10^8 unidades formadoras de colônia foram recuperadas de uma cultura líquida por centrifugação a 3000 g por 5 min a 4°C em tubos de fundo cônico de 15 mL. Em seguida foram ressuspensas em 10 mL de PBS gelado e novamente centrifugadas nas condições descritas anteriormente. As células precipitadas foram então ressuspensas em 1 mL de PBS gelado, misturadas ao mesmo volume de pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) e 3 mL do reagente Trizol[®].

Essa mistura foi agitada vigorosamente em agitador mecânico por cinco períodos de 2 min, sendo resfriada em gelo por 1 min entre as agitações. O homogenato foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi dividido em alíquotas de 1 mL em tubos de 1,5 mL para microcentrifuga. A cada tubo foi adicionado 200 μL de clorofórmio e a mistura foi

homogeneizada vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol. Novamente a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água-DEPC.

O RNA foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose, em condições desnaturantes (SAMBROOK et al., 1989).

3.10 RT-PCR

Os RNAs extraídos foram tratados com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA.

Cerca de 20 µg de RNA foram incubados a 37°C por 2 horas com 5 U de DNase I livre de RNase (Promega) em um volume final de 100 µL contendo DTT 5 mmol/L, 1 µL de RNase OUT (inibidor de RNase recombinante - Invitrogen) e o tampão contendo Tris-HCl pH 8,0 40 mmol/L; MgSO₄ 10 mmol/L; CaCl₂ 1 mmol/L. Para verificar a eficiência do tratamento com DNase I, foi retirada uma alíquota das amostras tratadas e realizada PCR em tempo real para o gene constitutivo α -tubulina de *P. brasiliensis*,

cuja sequência de nucleotídeos encontra-se disponível no site <http://143.107.203.68/pbver2/default.html>.

O RNA, tratado com DNase, foi extraído na proporção de 25:24:1 com a mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989) e precipitado com isopropanol conforme descrito anteriormente.

O RNA livre de DNA foi ressuspenso em 12 μ L de água-DEPC e submetido à reação de RT-PCR para a síntese de cDNA pelo kit comercial SuperScript® first-strand synthesis system (Invitrogen). O RNA foi incubado por 5 minutos a 65°C com dNTP 0,5 mmol/L e *primer* oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0,5 μ g. Após este período a mistura foi incubada por 1 minuto em banho de gelo e adicionada de MgCl₂ 5 mmol/L, DTT 10 mmol/L 1 μ L de RNase OUT (Invitrogen), e tampão contendo Tris-HCl pH 8,4 20 mmol/L; KCl 50 mmol/L. Novamente, a mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos e então adicionada de 50 U de transcriptase reversa SuperScript®. Após a adição da enzima, a mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 75°C. A reação foi terminada com adição de 1 μ L de RNase H e incubação a 37°C por 20 minutos.

3.11 PCR quantitativo em tempo real (Q Real Time PCR)

A determinação do nível de expressão gênica foi realizada seguindo o protocolo descrito por SEMIGHINI et al. (2002).

A quantificação do nível de expressão dos genes *aoxPb*, *ndhPb* e *nd6Pb* foi realizada em um aparelho de PCR em tempo real ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem) utilizando *primers* LUX (Invitrogen), no laboratório do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman do departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP. As seqüências dos genes *aoxPb* e α -tubulina (Ptub 1) encontram-se disponíveis no site <http://143.107.203.68/pbver2/default.html>, as seqüências dos genes *ndhPb* e *nd6Pb* estão depositadas no GenBank com os respectivos números de acesso CN240857 e AY268589.

Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando-se o programa D-LUX[®] Designer Software <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11263> e estão representados na Tabela 02.

Tabela 02- *Primers* utilizados em experimentos de Real-Time

<i>primers aoxPb</i>	
Forward	5'-GCTGGTGTCCCTGGAATGGT-3'
Reverse	5'-CGGGTCGATCCATCCATTATCC [FAM] G-3'
<i>primers ndhPb</i>	
Forward	5'-CTGGCGGAGAATGTTCTGAT-3'
Reverse	5'-CGGTGTCTCCCGTCTGTACCAC [FAM] G-3'
<i>primers nd6Pb</i>	
Forward	5'-GCAGGAGGACCACTCGCTATG-3'
Reverse	5'-CGGTTAGCTCTCCTGGCAGAAAC [FAM] G-3'
<i>primers α-tubulina</i>	
Forward	5'-ACCCAGCTTGAAACAGTGCT-3'
Reverse	5'-CACGGACCATCAGCCTTCAAACC [FAM] G-3'

FAM - 6-carboxifluoresceína

As possíveis variações na concentração inicial de mRNA entre as amostras foram corrigidas através da normalização com o gene constitutivamente expresso da α -tubulina.

Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata com um volume final de 10 μ L contendo 5 μ L do reagente Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ L dos *primers* a uma concentração de 1 μ mol/L cada e 1 μ L do cDNA. O perfil termal utilizado para as reações de PCR foi de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos e 40 repetições de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 minuto. Foram realizadas reações controle contendo apenas o reagente Master Mix e os *primers* para se verificar contaminações e a auto-fluorescência dos *primers* marcados.

Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para os pares de *primers* utilizados com diferentes concentrações de DNA genômico. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas de calibração foi determinada através de duas considerações: *P. brasiliensis* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma. Além disto, considerando que o tamanho do genoma do *P. brasiliensis* é igual a 30 Mb (SEMIGHINI et al, 2002), um genoma corresponde a aproximadamente 30 fg (10^{-15} gramas). Portanto, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de

P. brasiliensis correspondem a uma cópia de cada um dos genes do fungo.

Desta forma, foram realizadas reações com diferentes diluições (Tabela 4) do DNA genômico do fungo e por meio de regressão linear foi determinada a equação da reta correspondente à curva de calibração para cada par de *primers*.

Tabela 03- Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos *primers*

Nº de cópias/ μ L	Concentração do DNA
1	30 fg/ μ L
10	300 fg/ μ L
10^2	3 pg/ μ L
10^3	30 pg/ μ L
10^4	300 pg/ μ L
10^5	3 ng/ μ L
10^6	30 ng/ μ L
10^7	300 ng/ μ L

Uma vez estabelecidas as equações das curvas de calibração e considerando um coeficiente de correlação linear (R^2) maior que 0,99, as amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram analisadas.

3.12 Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em *P. brasiliensis*

A partir de 150 mL de uma cultura de 144 horas em meio PGY líquido a 35,5°C foram inoculadas 5×10^6 UFC/mL em 7 frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio PGY. Em 6 frascos foram adicionados os inibidores SHAM 2 mmol/L, KCN 1 mmol/L, antimicina 1,8 μ mol/L, rotenona 20 μ mol/L, KCN + SHAM e antimicina + SHAM. Esses frascos foram incubados a 26°C sob agitação de 160 rpm e entre períodos de 24 horas alíquotas de 40 μ L de cada cultura foram analisados em microscópio em aumento de 400X e alguns campos visuais foram fotografados (item 3.40). As culturas foram acompanhadas até 240 horas de crescimento.

3.13 Isolamento de DNA

O isolamento do DNA de *P. brasiliensis* foi realizado segundo SILVEIRA et al (1998) com algumas modificações. Para isso a cepa 18 de *P. brasiliensis* foi cultivada em meio líquido FAVA NETTO por 7 dias a 37°C. Após este período de pré-cultivo, o fungo foi semeado novamente no mesmo meio de cultura e incubado a 37°C por mais 7 dias. As células foram coletadas por filtração a vácuo em membrana de 0,22 μ m, secas com papel de filtro estéril e colocadas em cadinho estéril. A mistura foi adicionada de nitrogênio líquido e as células foram maceradas com pistilo. O procedimento de congelamento e maceração foi repetido por mais 6 vezes. Em seguida, adicionou-se 1 - 2 mL de tampão de extração de DNA estéril.

Posteriormente foram adicionados RNase A 30 $\mu\text{g/mL}$, proteinase K 200 $\mu\text{g/mL}$ e SDS 0,4% (p/v). A mistura foi incubada a 56°C por 12 horas e após este período, foi extraída com o mesmo volume de fenol tamponado por 3 vezes. A mistura foi centrifugada a 2.000 g por 15 minutos a 25°C e a fase orgânica descartada. À fase aquosa foi adicionado clorofórmio 1:1 (v/v) com homogeneização por inversão. Este último passo foi repetido por mais 2 vezes. Após centrifugação a 2.000 g por 5 minutos, a fase aquosa foi coletada e adicionada de 10% (v/v) de acetato de sódio 3 M pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol 95% (v/v). O tubo foi mantido a -20°C por 12 horas. Em seguida, foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seco e ressuspenso em água deionizada estéril.

3.14 Determinação da qualidade do DNA isolado

A concentração e a pureza do DNA foi determinada espectrofotometricamente, de acordo com SAMBROOK et al. (1989), através da relação entre as leituras da amostra em 260 nm e 280 nm ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$). A presença de DNA degradado foi analisada buscando-se possíveis arrastes (caudas) nas bandas de DNA separados por eletroforese em gel de agarose.

3.15 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). O gel de agarose foi preparado com tampão TAE. As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de carregamento para uma concentração final de 20%(v/v). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 90 V, durante 1 hora. Os géis foram corados por imersão em uma solução contendo brometo de etídeo (0,25 µg/mL) por 15 minutos, e em seguida foram lavados com água deionizada.

3.16 Clone do gene da Oxidase Alternativa de *P. brasiliensis*

Um clone de 1744 pb, contendo o gene da Oxidase Alternativa de *P. brasiliensis* (*aoxPb*) Anexo A, clonado à partir de uma biblioteca de cDNA, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman do Dep. de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP (a sequência de nucleotídeos do clone está depositada no site <http://143.107.203.68/pbver2/default.html> e corresponde ao contig PbCC006-F12). A partir desse clone foram desenhados *primers* para se obter a sequência de nucleotídeos do gene *aoxPb* através de reações de PCR utilizando-se DNA genômico de *P. brasiliensis*.

3.17 Análise do gene e sequência de aminoácidos deduzidos

As análises das sequências de nucleotídeos do gene *aoxPb* amplificadas a partir de DNA genômico e de cDNA assim como a

dedução e análises das seqüências de aminoácidos foram realizadas em programas de acesso livre nas páginas eletrônicas

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://workbench.sdsc.edu>

<http://us.expasy.org>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

A análise dos cromatogramas provenientes do sequenciamento de DNA foi realizada utilizando-se o programa Chromas (v. 1.55 Technelysium).

3.18 Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos (*Primers*)

Os iniciadores oligonucleotídeos para inserção de sítios de enzimas de restrição no gene *aoxPb* foram desenhados a partir de regiões selecionadas do clone de cDNA. Essa técnica possibilitou a clonagem do gene nos vetores de expressão pET-28a(+) (Novagen) (Anexo C), pYES2-NCT (Invitrogen) (Anexo D) e pYES2 (Invitrogen) (Anexo E).

Tabela 04-	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>aoxPb</i> para clonagem em plasmídeos de expressão
------------	---

Primer	Seqüência
AoxF1	5'-CCCTAAGCTTACC ATGG GATCC-3'
AoxR1	5'-GGGTTCTCTCGAGCATT TTA -3'
AoxF2	5'-CGCC ATGG ATCCGATCTCCG-3'
AoxR2	5'- TTAG ATGGAATTCTTTCTTTCCC-3'
AoxYES1	5'-CCCTAAGCTTACC ATGG GATCC-3'
AoxYES2	5'-GGGTTCTCTCGAGCATT TTA -3'
AoxYES3	5'-TATCCGGGATCCGCAGGACCC ATG -3'
AoxYES4	5'- TTAG AATTCATCCTTTCTTTCCCAGCC-3'

As seqüências de iniciação e terminação de transcrição do gene *aoxPb* estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas *NcoI*, *XhoI*, *NcoI*, *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *BamHI* e *EcoRI* respectivamente.

3.19 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA alvo foi realizada de acordo com SAIKI et al. (1985) e MEZEI & STORTS (1994), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Eppendorf). O DNA plasmidial (contendo o cDNA do gene *aoxPb*) 60 ng ou o DNA genômico 120 ng foi incubado em um meio contendo $MgCl_2$ 3 mmol/L, 0,8 μ mol/L de *primer* forward, 0,8 μ mol/L de *primer* reverse, dNTP 0,2 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8.4 (volume final de 50 μ L), em seguida desnaturado através da incubação a 94°C, durante 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 2,5 U da enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) ou

TripleMaster® polymerase Mix (Invitrogen). Diferentes perfis termiais foram utilizados para o anelamento dos *primers* e extensão pela DNA polimerase.

A enzima Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen) foi utilizada durante a padronização das reações de PCR e a enzima TripleMaster® polymerase Mix (Invitrogen), por possuir atividade 3'-5'corretora de erros de incorporação de bases, foi utilizada apenas nas reações já padronizadas e cujo fragmento amplificado (*aoxPb*) seria clonado em plasmídeos.

3.20 Inserção do DNA em plasmídeo de clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, com as diferentes combinações de *primers* (Tabela 01), foram precipitados com 10% (v/v) de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol absoluto. Essa mistura foi mantida a -20°C por 12 horas e em seguida foi centrifugada a 20.400 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado e posteriormente seco a temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi ressuspenso em água deionizada estéril e inserido em um plasmídeo conforme descrito por MEZEI & STORTS (1994). Uma mistura contendo 100 ng do DNA precipitado, 50 ng do plasmídeo PCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) (Anexo B) e 0,5 µL do tampão de ligação contendo Tris-HCl 250 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 50 mmol/L; ATP 5 mmol/L; DTT 5 mmol/L

e polietileno glicol-8000 25% p/v; foi incubada em um volume final de 3 μ L à temperatura ambiente por 10 minutos.

3.21 Preparo de células de *E. coli* competentes

3.21.1 *E. coli* cepas XL1-Blue e DH5- α

As células competentes foram produzidas de acordo com LENDERBERG & COHEN (1974) e MORRISON (1977). As células foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação 150 rpm por 12 horas. Em seguida os 5 mL foram adicionados a 500 mL do mesmo meio LB e novamente incubadas nas mesmas condições anteriores até uma densidade ótica entre 0,6 e 0,7 em comprimento de onda a 600 nm.

A cultura foi mantida no gelo por 5 minutos e centrifugada a 3.000 *g* por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 100 mL de MgCl₂ 0,1 mol/L gelado, centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em 100 mL de CaCl₂ 0,1 mol/L gelado e mantidas no gelo por 20 minutos. Em seguida foram novamente centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em 21,2 mL de CaCl₂ 0,1 mol/L gelado e 3,8 mL de glicerol 80% (v/v) estéril.

As células foram aliquotadas em volumes de 0,2 mL e armazenadas a -70 °C.

3.21.2 *E. coli* cepa Rosetta(DE3)pLysS™

O preparo de células competentes da cepa Rosetta(DE3)pLysS™ de *E. coli* foi realizado de acordo com HANAHAN (1983) modificado.

As bactérias foram semeadas em meio LB sólido contendo 10 mmol/L de MgCl₂ ou MgSO₄ (utilizar preferencialmente material proveniente de estoque a -70°C) e incubadas a 37°C durante 12 horas para se obter colônias isoladas.

As células foram inoculadas em 5 mL de meio SOB e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm por 2 horas. Em seguida foi adicionado 50 mL ao pré-inóculo de meio SOB pré-aquecido e a agitação foi mantida por mais 2-3 horas até que se obtivesse uma DO_{550nm} de 0,5-0,6.

O frasco foi resfriado em banho de gelo e adicionado 0,5 mL de MgCl₂ 1,0 mol/L. As bactérias foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL estéreis previamente imersos em banho de gelo e mantidos em repouso por 15 minutos. Em seguida foram centrifugados a 1.100 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado gentilmente ressuspenso em 10 mL da solução RF1 a qual foi mantida em repouso no gelo por 15 minutos. Após este período foi novamente centrifugado sob as mesmas condições durante 12 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias competentes foi ressuspenso gentilmente em 2 mL de RF2, separado em alíquotas de 0,4 mL em tubos eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C.

3.22 Transformação de células de *E. coli* competentes

A transformação das células competentes de *E. coli* XL₁-Blue, DH5- α , e Rosetta(DE3)pLysS™ foi realizada por choque térmico, de acordo com SAMBROOK et al., (1989). As células foram retiradas do freezer a -70°C e deixadas descongelar no gelo. Um volume de 50 μ L das células foi adicionado de 2 μ L da reação de ligação do plasmídeo, sem agitação.

A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 60-120 segundos. Após este tempo, as células foram colocadas em gelo novamente e adicionadas de 250 μ L do meio SOC. A suspensão de células foi agitada horizontalmente a 225 rpm por 1 hora a 37°C. As células foram semeadas em meio LB sólido contendo os antibióticos necessários para a seleção das bactérias (ampicilina 75 μ g/mL e/ou kanamicina 35 μ g/mL e/ou cloranfenicol 35 μ g/mL). Quando o plasmídeo de clonagem possibilitava a análise da formação de colônias azuis ou brancas pela inserção do fragmento a ser clonado no meio do gene *LacZ* α , eram adicionados 40 μ L de IPTG 100 mmol/L e 20 μ L de X-Gal 40 mg/mL. Após a semeadura as placas foram incubadas por 12 horas a 37°C e as colônias que cresceram foram isoladas para analisar a presença de plasmídeo e inserto.

3.23 Isolamento dos plasmídeos

A extração do plasmídeo foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada colônia selecionada foi semeada separadamente em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido adicionado dos antibióticos necessários e incubada por 12 horas a 37°C. Cerca de 1,5 mL da suspensão de células de cada tubo foram transferidos para tubos de microcentrífuga e estes centrifugados a 20.400 g por 1 minuto a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de lise para extração de plasmídeo, foram adicionados RNase A 10 µg/mL e 200 µL de uma solução de NaOH 0,2 mol/L / SDS 0,1% (p/v). A mistura foi homogeneizada gentilmente por 4-5 vezes. Foram adicionados, 150 µL de acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,4. A suspensão foi centrifugada a 20.400 g por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 400 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada em agitador mecânico. Após centrifugação a 20.400 g por 4 minutos a 4°C, a fase aquosa superior foi coletada e o DNA plasmidial foi precipitado com 1,0 mL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada a 20.400 g por 15 minutos a 4°C para se recuperar o plasmídeo que foi então lavado com 200 µL de etanol 75% (v/v). O DNA plasmidial precipitado foi seco e ressuspenso em 20 µL de água deionizada estéril.

3.24 Digestão do plasmídeo de clonagem e sequenciamento

A digestão do plasmídeo PCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) com enzima de restrição foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada µg de DNA foi digerido com 4 U de enzima de restrição para garantir a digestão completa dos plasmídeos. A enzima utilizada para a reação de digestão foi a *EcoRI* uma vez que o plasmídeo PCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) apresenta 2 sítios de restrição para esta enzima flanqueando a região de inserção do DNA amplificado. A reação de digestão foi realizada a 37°C por 2 horas. A análise da digestão foi processada por eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.7.

3.25 Preparo e seqüenciamento das amostras selecionadas

As amostras selecionadas para seqüenciamento foram submetidas à nova extração de DNA plasmidial utilizando-se o Kit QIAprep[®] Miniprep (QIAGEN). As amostras foram então preparadas para a reação de seqüenciamento utilizando o kit BigDye[™] Cycle Sequencing v3.1 (Abi Prism). Cerca de 250 - 500 ng do DNA plasmideal, 2 µL do reagente BigDye, contendo os dideoxiribonucleotídeos marcados, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo e água deionizada estéril para um volume final de 20 µL foram submetidos a uma reação de amplificação com o seguinte perfil termal: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, repetidos 35 ciclos. O produto da PCR foi precipitado pela adição de 2 µL de tampão acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,2 e 50 µL de etanol absoluto, incubando-se

por 15 minutos a 0°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.400 *g* por 20 minutos a 4°C e após lavagem do precipitado com etanol 70% (v/v) a amostra foi seca e ressuspensa em tampão de carregamento (fornecido pelo fabricante). A reação de seqüenciamento foi realizada segundo SANGER et al. (1977) em um seqüenciador automático Applied Biosystems, modelo 3100 no laboratório da Prof^a Dr^a Maria Helena Goldman do Dep. de Biologia da FFCLRP-USP.

3.26 Clonagem do gene *aoxPb* nos vetores de expressão pET-28a(+) (Novagen), pYES2 e pYES2-NCT (Invitrogen)

Os plasmídeos de expressão e o plasmídeo PCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) contendo o gene *aoxPb*, amplificado pela reação de PCR com os *primers* necessários para clonagem nos respectivos plasmídeos de expressão, foram digeridos com as enzimas de restrição necessárias de acordo com SAMBROOK et al. (1989). O DNA plasmidial (10 µg) foi incubado com as diferentes enzimas de restrição durante 2 horas, a 37°C. Os tampões utilizados foram àqueles recomendados pelo fabricante. Nos casos de digestão dupla em que as enzimas requeriam tampões diferentes, a digestão foi efetuada em duas fases ajustando a concentração de NaCl e MgCl₂ para a digestão da segunda enzima.

As digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos de interesse foram extraídos a partir do gel. Essa extração foi realizada cortando-se o fragmento do gel contendo a banda de tamanho desejado, em seguida o DNA foi

eluído do gel por centrifugação a 2.700 *g* por 5 minutos em colunas de sílica (Micropore).

Estes fragmentos de DNA extraídos foram quantificados conforme o item 3.6 e em seguida ligados pela reação da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). A ligação se processou por 12 horas a 16°C com uma relação de número de pontas entre inserto e plasmídeo de 3/1 pmoles. Na reação foram utilizados 0,2 U de enzima, 4,0 µL de tampão [Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.6, MgCl₂ 10 mmol/L, ATP 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, polietileno glicol-8000 5% (p/v)] e H₂O para um volume final de 20 µL.

3.27 Análise da Clonagem do gene *aoxPb* nos vetores de expressão

Bactérias *E. coli* XL1-Blue ou DH5- α foram transformadas com 2,0 µL das reações de ligação (item 3.19) e em seguida os plasmídeos foram extraídos de acordo com o item 3.16.

A análise da clonagem do gene nos plasmídeos de expressão foi realizada por digestão dos plasmídeos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas durante a clonagem (item 3.19). Em seguida essas reações de digestão foram submetidas à eletroforese para confirmação da liberação do inserto (gene *aoxPb*). Alguns clones foram seqüenciados para verificar se o gene havia sido clonado em fase de leitura correta em relação ao promotor que controlaria a expressão do gene alvo.

Os plasmídeos pET28*aoxPb* [pET-28a(+) contendo o gene *aoxPb* sem caudas de histidina], pET28*aoxPb*-CT [pET-28a(+) contendo o

gene *aoxPb* com cauda de 6 histidinas na porção carboxi-terminal], pYESaoxPb [pYES2 contendo o gene *aoxPb* sem caudas de histidina] e pYESaoxPb-NCT [pYES2NCT contendo o gene *aoxPb* com caudas de 6 histidinas nas porções amino e carboxi-terminal] foram selecionados para utilização nos experimentos de expressão em *E. coli* e *S. cerevisiae*.

3.28 Indução, em pequena escala, da expressão do gene *aoxPb* em *E. coli*

Foram selecionados clones contendo plasmídeos com o gene *aoxPb* inserido em fase de leitura correta e sem nenhuma alteração de nucleotídeo indesejada. Estes plasmídeos foram utilizados para transformação da cepa Rosetta[™] (DE3)pLysS. A transformação destas cepas foi realizada de acordo com o item 3.15.

Uma colônia transformada positivamente foi retirada da placa e inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo a concentração necessária de antibióticos, glucose 0,2% (p/v) e incubada sob agitação de 225 rpm por 12 horas a 37°C.

Após este período 500 µL da suspensão foram inoculados em 50 mL de meio LB e incubado sob as mesmas condições até a cultura atingir uma $DO_{600} = 0,4$. A cultura foi separada em duas frações de 25 mL em uma delas foi induzida a expressão do gene *AOXPb* pela adição de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo), concentração final 1,0 mmol/L ou 0,5 mmol/L dependendo do

experimento realizado. Alíquotas de 1,5 mL de cultura foram coletadas das duas frações (induzida e não induzida) no tempo zero, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h e 12 h. Essas amostras (alíquotas) foram centrifugadas a 18.000 *g* por 5 minutos a 4°C. As células e o sobrenadante (meio de cultura) foram separados e congelados a -20°C. As células obtidas pela centrifugação das amostras foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lise 1 ou tampão PBS 1X/Triton®-X100 0,5% (p/v). Em seguida foram sonicadas no gelo 6 vezes por 15 segundos em intervalos de 1 minuto entre cada sonicação. Foi utilizado um sonicador MICROSON™ ultrasonic cell disruptor (Misonix incorporated, Farmingdale, N.Y.) ajustado para 60% de potência.

As amostras sonicadas foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e novamente foram separados o precipitado e o sobrenadante. Este precipitado em alguns experimentos foi ressuspenso em tampão de desnaturação e novamente sonicado na tentativa de se solubilizar o máximo das proteínas de membrana insolúveis.

3.29 Preparo de células de *S. cerevisiae* competentes e transformação

A competência e transformação de células de *S. cerevisiae* foram realizadas segundo GIETZ et al. (1995).

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* cepa INVSc1 foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubado sob agitação a 160 rpm por 12 horas a 30°C.

Após este período foi determinada a DO_{600nm} (densidade ótica em 600 nm) da cultura, a qual foi diluída para 50 mL de meio YPD com uma DO_{600} final de 0,4 e incubada por mais 2 ou 4 horas. As células foram centrifugadas a 600 g por 2 minutos a temperatura ambiente, ressuspensas em 40 mL de tampão TE 1X e novamente centrifugadas por 2 minutos. As células foram ressuspensas em 2 mL de solução TE 0,5X/LiAc 1X os quais foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos.

Para cada reação de transformação foram misturados 100 µL de suspensão de células, 1 µg de DNA plasmidial e 100 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado (Invitrogen). A esta mistura foi adicionado 700 µL de solução contendo LiAc 1X/PEG-3640 40%/TE 1X, homogeneizado bastante e incubado por 30 minutos a 30°C. Em seguida foi adicionado 88 µL de DMSO, homogeneizado, e aquecido por 7 minutos a 42°C. As células foram centrifugadas a 2.500 g por 10 segundos a temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de TE 1X, precipitadas novamente e ressuspensas em 50-100 µL de TE 1X. Por fim essas células foram semeadas em placas com meio de cultura seletivo SC-URA⁻.

3.30 Indução, em pequena escala, da expressão do gene *aoxPb* em *S. cerevisiae*

Foram selecionadas colônias contendo plasmídeos com o gene *aoxPb* inserido em fase de leitura correta. Estes plasmídeos foram utilizados para transformação em *S. cerevisiae*. A transformação destas cepas foi realizada de acordo com o item 3.14.

Uma colônia transformada positivamente foi retirada da placa com meio SC_{Glucose}(URA⁻) sólido e inoculada em 50 mL de meio SC_{Rafinose}(URA⁻) líquido e incubada sob agitação de 225 rpm por 36 horas a 30°C.

No início do segundo dia foi determinada a DO_{600nm} da cultura, a qual foi diluída para 50 mL de meio SC_{Galactose}(URA⁻) com uma DO_{600nm} final de 0,4 a fim de se induzir a transcrição do promotor *GAL1* dos plasmídeos pYES2 e pYES2-NCT e conseqüente expressão do gene *aoxPb*.

Alíquotas de 1,5 mL de cultura foram coletadas no tempo zero, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h e 12 h. Essas alíquotas foram centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos a 4°C e, o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de água estéril e centrifugado novamente a 20.400 g por 30 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi congelado e ressuspenso em 500 µL de tampão de lise para levedura, centrifugado a 1.500 g por 5 minutos a 4°C e em seguida as células foram ressuspensas em 100 µL do tampão

de lise e adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro (0,4-0,6 μm). A lise das células foi processada por agitação em agitador mecânico por 30 segundos seguida por resfriamento em gelo por 30 segundos. Esse processo foi repetido por 4 vezes. A mistura foi centrifugada a 20.400 g por 10 minutos a 4°C foram separados precipitado e sobrenadante, os quais foram preparados para serem submetidos a eletroforese em SDS-PAGE.

3.31 Produção de esferoplastos de *S. cerevisiae* e purificação de mitocôndrias

Os esferoplastos foram produzidos e a purificação de mitocôndrias foi realizada de acordo com GLAB et al. (1990), com algumas modificações. As células de *S. cerevisiae* foram coletadas do meio de cultura líquido (SC-galactose ou SC-não fermentativo) por centrifugação a 3.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida foram ressuspensas em tampão de pré-incubação na proporção de 1,0 g de células úmidas para 4,0 mL de tampão e incubadas sob agitação de 100 rpm por 30 minutos a 33°C.

Após a pré-incubação, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e uma vez com tampão de digestão, ressuspensas em tampão de digestão na proporção de 1,0 g para 2,0 mL de tampão e adicionados 2,0 mg de enzima (zymolyase20T) por grama de células iniciais, além de DTT 2 mmol/L. A digestão ocorreu sob agitação a 100 rpm por 45 minutos a 33°C.

A formação de esferoplastos foi monitorada ao longo do tempo de digestão pela leitura da DO_{600} de diluições das células em água destilada (1:200), a lise celular pela diluição em água é acompanhada por diminuição da densidade ótica.

Após a digestão as células foram centrifugadas a 3.000 *g* por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão de digestão gelado. Em seguida foram adicionados as células 1,5 mL de tampão de lise 1 (gelado) por grama de células iniciais, além de PMSF 1,0 mmol/L e PIC. As células foram lisadas em um sistema de lise manual tipo *potter* com 10 a 15 movimentos de fricção e então adicionados 1,5 ml de tampão de lise 2 (gelado) por grama de células iniciais. A mistura foi centrifugada a 2.000 *g* por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 18.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi ressuspensão gentilmente em 1,0 ml de tampão para ressuspensão mitocondrial (gelado) por grama de células iniciais e em seguida a mistura foi centrifugada a 2.000 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 18.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi novamente ressuspensão gentilmente em tampão para ressuspensão mitocondrial (gelado) no menor volume possível, em torno de 100 μ L.

3.32 Determinação da concentração de proteínas (método de Biureto)

Uma alíquota (20 μ L) da amostra a ser determinada foi misturada a 100 μ L de uma solução de ácido deoxicólico 5% (p/v) e água para um volume final de 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reativo de biureto, composto por sulfato cúprico 0,15% (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,6% (p/v) e NaOH 0,75 mol/L. Após 10 minutos a absorbância foi determinada em 540 nm contra um branco de reagentes e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições da amostra utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão protéico (CAIN & SKILLETER, 1987).

3.33 Determinação da concentração de proteínas (método de Bradford)

A concentração de proteínas presentes nas amostras, precipitados e sobrenadantes, foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). Os precipitados foram diluídos 200X e os sobrenadantes 50X, foram utilizados 160 μ L das diluições e 40 μ L do reagente de Bradford (Bio-Rad), a leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de contra um branco de reagentes e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas

condições da amostra utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão protéico. Após a dosagem das proteínas as amostras foram acertadas para que em 15 µL de amostra aplicados no gel de SDS-PAGE contivesse aproximadamente 5,0 µg de proteínas.

3.34 Preparo das amostras para a análise eletroforética em SDS-PAGE

As amostras da expressão em *E. coli* foram preparadas utilizando-se 25 µL dos sobrenadantes, obtidos conforme o item 3.21, misturados a 25 µL de tampão de amostra 2x concentrado, o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de tampão de lise ou tampão de desnaturação e 20 µL de tampão de amostra 2X concentrado.

As amostras da expressão em *S. cerevisiae* foram preparadas tomando-se 25 µL de sobrenadante misturados a 25 µL de tampão de amostra 2X concentrado, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão de lise para levedura dos quais foram retirados 25 µL e misturados a 25 µL de tampão de amostra 2X concentrado.

Essas misturas de sobrenadantes e precipitado com tampão de amostra foram fervidas por 5 minutos e submetidas a eletroforese (SDS-PAGE).

3.35 SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio)

As amostras de proteínas preparadas como descrito no item 3.23 foram analisadas por SDS-PAGE aplicando-se no gel entre 15 e 20 μ L de amostra. O gel de poliacrilamida-SDS foi produzido segundo LAEMMLI (1970). O gel de empilhamento foi preparado com concentração 5% em tampão Tris-HCl 1 mol/L pH 6,8 e o gel de corrida 12% em Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8 (os reagentes e quantidades utilizadas no preparo de um gel, são descritos no item 3.1.21). A eletroforese se processou com amperagem constante de 10 mA por gel, durante 2,0 h, o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,3 e ao final da eletroforese o gel foi corado pela solução de Coomassie e descorado por lavagens em solução descolorante.

Como padrão de peso molecular foi utilizado o “prestained SDS-PAGE standards, broad range” (Bio-Rad), cujas bandas constituem das seguintes proteínas: Miosina, β -galactosidase, albumina de soro bovino, ovalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina de soja, lisozima e aprotina.

3.36 Western Blot

As proteínas separadas eletroforeticamente foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo TOWBIN et al. (1979), através de um sistema Mini Trans-Blot (Bio-

Rad). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE e a membrana de nitrocelulose em um sistema “sanduíche” entre papéis de filtro protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética, contendo tampão de transferência a 4°C, posicionada sobre um agitador magnético para a homogeneização do tampão e aplicou-se uma corrente de 350 mA por 60 minutos.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão TBS-T contendo 5% (p/v) de leite desnatado por 12 horas a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão TBS-T e incubadas com diferentes diluições do anticorpo primário anti-His-Tag (Amersham Biosciences) por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas por duas vezes, uma vez por 15 minutos e 3 vezes por 5 minutos com o mesmo tampão a uma razão de 4 mL de tampão por cm² de membrana.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (anti-anticorpo de camundongo), na diluição apropriada, foi incubado com as membranas por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado da mesma maneira que anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação constantes no kit “ECL Western blotting detection reagents and analysis system” (Amersham Biosciences) foram misturadas, de modo que o

volume final mantivesse uma razão de 0,125 mL/cm² de membrana. A membrana foi incubada com esta mistura por 60 segundos e o excesso de solução foi seco em papel absorvente. A membrana foi embrulhada em papel filme e colocada em um cassete de autoradiografia para exposição. A marcação dos anticorpos primários foi visualizada em filme fotográfico.

3.37 Determinação da produção de EROs em células fúngicas

Para a determinação da formação de EROs em células fúngicas foi utilizada a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (Invitrogen), conforme descrito por RUY et al. (2006) com algumas modificações. Foram utilizadas células de *P. brasiliensis* protoplastizadas (item 3.5), ou células protoplastizadas de *S. cerevisiae*/pYES2 e *S. cerevisiae*/pYESaoxPb (item 3.31).

As células (5×10^6 UFC/mL) foram incubadas a 37°C por 30 min em tampão de respiração na presença da sonda fluorescente CM-H₂DCFDA 5 µmol/L (Invitrogen) e dos substratos oxidáveis piruvato 10 mmol/l, citrato 10 mmol/l, malato 10 mmol/l, glutamato 10 mmol/l, α-cetoglutarato 10 mmol/l, succinato 10 mmol/l, NADH 2 mmol/l e NAD⁺ 2 mmol/l. Com essa incubação, a sonda de caráter apolar penetra na célula sendo hidrolisada por esterases da membrana plasmática adquirindo um caráter polar. Com essa alteração a sonda acumula-se no interior da célula sofrendo oxidação na presença de espécies

reativas de oxigênio. Com a oxidação a molécula passa a emitir fluorescência com comprimento de onda entre 525–530 nm quando excitada por luz de comprimentos de onda em torno de 500 nm.

Nos ensaios foram utilizados 503 nm para excitação e 529 nm para leitura da fluorescência emitida em espectrofluorímetro Hitachi – F4500. As leituras foram realizadas sob agitação a 30°C. Após a leitura inicial (T0) foram adicionados inibidores da cadeia respiratória mitocondrial KCN 1 mmol/L, antimicina A 1,8 µmol/L e rotenona 2 µmol/L, no tubo controle não foi adicionado nenhum inibidor. Após a adição dos inibidores foram realizadas outras leituras da fluorescência ao longo do tempo de incubação. Os valores de fluorescência obtidos ao longo do período de incubação foram divididos pelos valores de T0, a partir dessa relação pôde-se identificar o efeito dos inibidores sobre a geração de EROs.

3.38 Drogas indutoras de estresse oxidativo e expressão do gene *aoxPb* em leveduras de *P. brasiliensis*

A partir de uma cultura de 96 horas em meio PGY líquido foram inoculadas 5×10^6 UFC/mL em 10 frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio PGY. Em 9 desses frascos foram adicionadas as drogas H₂O₂ 30 mmol/L, menadiona 0,5 mmol/L, nitroprussiato de sódio (NPS) 1 mmol/L, rotenona 2 µmol/L, KCN 1 mmol/L, antimicina 1,8 µmol/L, SHAM 2 mmol/L, menadiona + NPS e rotenona + KCN. As culturas foram incubadas a 35,5°C por 12

horas a 160 rpm, em seguida as mesmas drogas foram adicionadas novamente e as células incubadas nas mesmas condições por mais 1 hora. Por fim as células foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes em PBS. O isolamento do RNA foi processado conforme descrito no item 3.9 e a quantificação da expressão gênica realizada por PCR em tempo real.

3.39 Sistemas de registro de imagens

As fotografias de eletroforeses em gel de agarose, corados com brometo de etídeo (para DNA) item 3.7 e em gel de poliacrilamida corados pelo Comassie - Brilliant Blue "G" (para proteínas) item 3.24 foram registradas pelo sistema de fotografia EDAS120 Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

As fotografias da conversão do fungo *P. brasiliensis* de micélio para levedura na presença de drogas e inibidores foram realizadas em microscópio Olympus BX51 modelo U-LH100-3 (Tóquio, Japão) acoplado a câmera fotográfica digital Olympus modelo C-5060 wide zoom (Tóquio, Japão). A captura das imagens foi realizada em aumento de 400X. As fotografias em microscópio foram realizadas no laboratório da Prof. Dra. Yara Lucisano Valim do departamento de Física e Química da FCFRP-USP.

3.40 Análises estatísticas

A análise estatística utilizada para comparação entre os valores dos níveis de expressão gênica obtidos por PCR em Tempo-Real foi a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Newman Keuls. A análise para comparação entre os valores de produção de EROs em células fúngicas foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. Em ambas análises foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA).

4- Resultados

4- RESULTADOS

4.1- Medidas do potencial de membrana mitocondrial e consumo de oxigênio em esferoplastos de *P. brasiliensis*

Efeitos de drogas sobre mitocôndrias, assim como, medidas de respiração e potencial de membrana mitocondrial em células fúngicas podem ser avaliados utilizando-se mitocôndrias isoladas ou esferoplastos (células permeabilizadas pela digestão da parede celular). O isolamento de mitocôndrias viáveis para ensaios funcionais, em fungos, apresenta um baixo rendimento quando comparado ao mesmo procedimento em células de mamíferos. Dessa forma, para a caracterização funcional de mitocôndrias no fungo *P. brasiliensis* a utilização de esferoplastos foi a abordagem escolhida.

Os ensaios foram realizados com a forma leveduriforme de *P. brasiliensis* em diferentes tempos ao longo da curva de crescimento. Como o protocolo para produção de esferoplastos exige grande quantidade de células (cerca de 2,0 g de células úmidas) não foi possível utilizar esferoplastos produzidos a partir de células com menos de 60 horas de crescimento. Um dos motivos foi a pouca quantidade de células, outro motivo foi a mistura de células provenientes do inóculo (com cerca de 140 horas de crescimento) tornando a população de células da cultura não representativa do real estágio de crescimento celular. Dessa forma os ensaios com esferoplastos utilizaram

células desde 60 até 240 horas de crescimento. Este período corresponde a segunda metade da fase exponencial e a fase estacionária de crescimento.

4.1.1- Medidas do consumo de oxigênio por esferoplastos de *P. brasiliensis*

Na figura 3 estão demonstrados resultados representativos de experimentos de medida de consumo de oxigênio em células com 60, 96 e 120 horas de crescimento. O consumo de oxigênio pelas células foi induzido pela adição de substratos oxidáveis como NADH (2 mmol/L) ou succinato (10 mmol/L) na presença de inibidor do complexo I (rotenona 20 μ mol/L). O consumo gerado pela adição dos substratos foi aumentado com a adição de ADP 2 μ mol e em seguida esse aumento foi totalmente revertido pela adição de oligomicina 4 μ g (inibidor da F_1F_0 -ATPase). A adição de FCCP 25 μ mol/L também gerou um aumento no consumo de oxigênio, o qual foi parcialmente inibido pela adição do inibidor do complexo III, antimicina A 0,5 μ g. Em seguida a adição da mistura de TMPD 300 μ mol/L e ascorbato 0,5 mmol/L, compostos que doam elétrons diretamente a citocromo *c*, restabeleceu o consumo de oxigênio, o qual foi parcialmente inibido com a adição de KCN 1 mmol/L, um inibidor do complexo IV.

A oxidação de NADH exógeno pelas células e a inibição parcial do consumo de oxigênio por cianeto sugerem a presença

de uma NADH desidrogenase alternativa externa e de uma oxidase alternativa. Essas hipóteses serão melhor demonstradas posteriormente.

Figura 03- Consumo de oxigênio em esferoplastos de *P. brasiliensis*, referentes a células da fase de crescimento exponencial. As células permeabilizadas foram adicionadas em tampão de respiração (item 3.1.3) em uma concentração 5×10^6 UFC/mL e rotenona $20 \mu\text{mol/L}$. As adições seguintes indicadas pelas setas foram: NADH 2 mmol/L ou succinato 10 mmol/L , ADP $2,0 \mu\text{mol}$, oligomicina $4 \mu\text{g}$, FCCP $25 \mu\text{mol/L}$, antimicina A $0,5 \mu\text{g}$, mistura de TMPD $300 \mu\text{mol/L}$ e ascorbato $0,5 \text{ mmol/L}$, e KCN 1 mmol/L . Os valores entre parênteses indicam a taxa de consumo de oxigênio em η -átomos de oxigênio/min/ 9×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

O consumo de oxigênio na presença de uma mistura de substratos do complexo I (malato, piruvato, glutamato, α -cetoglutarato e citrato) (Figura 4A) foi menor do que na presença de succinato ou NADH como substratos oxidáveis (Figura 3). Por outro lado, a adição da mistura de substratos do complexo I na presença de NAD^+ 2 mmol/L (Figura 4B) induziu um consumo de oxigênio maior do que o observado com estes mesmos substratos sem a adição de NAD^+ (Figura 4A). Em ambos os casos, a adição de ADP 2 μmol causou um leve aumento no consumo de oxigênio e esse consumo foi sensível à inibição por rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$ (inibidor do complexo I) e flavona 500 $\mu\text{mol/L}$ (inibidor de NADH desidrogenases alternativas). O consumo de oxigênio induzido por esses substratos foi maior em células provenientes de culturas com 60 e 120 horas de crescimento.

Os esferoplastos na presença de NAD^+ isoladamente também foram capazes de consumir oxigênio, sendo que, esse consumo ocorreu em todos os tempos, mas com maior intensidade em 96 horas de crescimento. Além disso, o consumo de oxigênio gerado utilizando-se NAD^+ foi estimulado pela adição de ADP, que por sua vez foi inibido por flavona, mas foi praticamente insensível a inibição por rotenona (resultados não mostrados).

Figura 04- Influência de substratos do Complexo I e NAD^+ no consumo de oxigênio em esferoplastos de *P. brasiliensis*. Figura representativa de ensaios com células de 60 e 120 horas de crescimento. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 3. **A**- As setas indicam adições de: Subst.- Substratos do complexo I (malato, piruvato, glutamato, α -cetoglutarato e citrato - 10 mmol/L cada), ADP 2 μmol , rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$ e flavona 500 $\mu\text{mol/L}$. **B**- Subst.- Substratos do complexo I (malato, piruvato, glutamato, α -cetoglutarato e citrato - 10 mmol/L de cada e NAD^+ 2 mmol/L), ADP 2 μmol , rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$ e flavona 500 $\mu\text{mol/L}$. Os valores entre parênteses indicam a taxa de consumo de oxigênio em n-átomos de oxigênio/min/ 9×10^6 UFC. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

Na tabela 5 está apresentada a velocidade de estados respiratórios mitocondriais na presença de diferentes substratos oxidáveis. Pode-se observar que as mitocôndrias de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme foram capazes de

fosforilar o ADP utilizando-se diferentes substratos. Entretanto, ao utilizar uma mistura de substratos do complexo I com ou sem a presença de NAD^+ o consumo de oxigênio foi menor, mas ainda assim foi sensível à adição de ADP. Com exceção do succinato, os substratos ligados a flavoproteínas, diidroorotato e α -glicerol-3-fosfato, não induziram aumento no consumo de oxigênio.

Tabela 05- Oxidação de diferentes substratos por esferoplastos de *P. brasiliensis*

Substratos	Velocidade de respiração mitocondrial (η átomos de oxigênio/min/9 x 10 ⁶ UFC)	
	Estado 3	Estado 4
Coquetel de substratos ^b	74,8 ± 2,0 ^a	63,7 ± 1,4
NADH	55,2 ± 4,8	43,9 ± 3,3
Succinato	53,5 ± 2,9	44,2 ± 4,5
NADH/Succinato	72,3 ± 2,7	51,4 ± 0,5
Coquetel de substratos sem NADH	64,1 ± 6,5	48,9 ± 8,3
TMPD/ascorbato	37,8 ± 2,2	37,8 ± 2,2
Substratos de sítio I ^c	19,8 ± 1,6	13,55 ± 0,2
Substratos de sítio I/NAD ⁺	27,2 ± 1,3	20,5 ± 2,3
Substratos ligados a flavoproteínas ^d	ni	ni

As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 03.

^a Média ± S.E.M. Valores de 3 determinações.

^b NADH, succinato, malato, piruvato, glutamato, α -cetoglutarato, citrato, diidroorotato e α -glicerol-3-fosfato

^c Malato, piruvato, glutamato, α -cetoglutarato e citrato

^d Diidroorotato e α -glicerol-3-fosfato

ni- não induziu aumento no consumo de oxigênio

4.1.1.1- Consumo de oxigênio resistente à inibição por cianeto e antimicina A em *P. brasiliensis*

Conforme demonstrado na figura 3, o consumo de oxigênio não foi totalmente inibido por KCN, sugerindo a participação de uma oxidase alternativa.

Para verificar a atividade desta enzima foi avaliado o consumo de oxigênio pelas células e a influência de inibidores na cadeia respiratória mitocondrial.

Na figura 5A pode-se observar que a adição de KCN ou antimicina A não inibiu totalmente o consumo de oxigênio pelas células de *P. brasiliensis*, demonstrando uma respiração mitocondrial resistente à inibição por cianeto. A adição de GMP ou AMP, estimuladores de oxidases alternativas em fungos, aumentou o consumo de oxigênio, que posteriormente foi inibido pela adição de SHAM ou BHAM, inibidores específicos de oxidases alternativas, revelando uma respiração mitocondrial sensível ao estímulo por nucleotídeos purínicos e a inibição por SHAM ou BHAM.

Na figura 5B pode-se observar que a adição prévia de SHAM ou BHAM inibiu a capacidade estimulatória de AMP ou GMP sobre o consumo de oxigênio, assim como a resistência a cianeto.

A partir destes resultados pode-se observar, que após a inibição da via da citocromo *c*, o consumo de oxigênio pela via da oxidase alternativa foi equivalente a 20% da quantidade de

oxigênio consumida pela via principal não inibida. E com a indução por AMP ou GMP esse consumo pela oxidase alternativa atingiu 40%. No entanto, a inibição apenas da via alternativa afetou levemente o consumo da via principal, cerca de 13%.

Figura 05- Avaliação da atividade oxidase alternativa em esferoplastos de *P. brasiliensis*. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 3. As adições foram: NADH 2 mmol/L ou succinato 10 mmol/L, KCN 1 mmol/L ou antimicina A 0,5 μ mol/L, GMP 2 mmol/L ou AMP 2 mmol/L e SHAM 2 mmol/L ou BHAM 2 mmol/L. Os valores entre parênteses indicam a taxa de consumo de oxigênio em η -átomos de oxigênio/min/9 x 10⁶ UFC. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

4.1.1.2- Consumo de oxigênio resistente à inibição por rotenona e sensível a flavona em *P. brasiliensis*

NADH exógeno foi oxidado, sugerindo a presença de uma enzima NADH desidrogenase alternativa externa (Figura 3).

Na figura 6A e 6B pode-se observar que o consumo de oxigênio de esferoplastos energizados com NADH 2 mmol/L foi insensível à inibição por altas concentrações de rotenona (40 μ mol/L), um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, mas foi sensível à inibição por flavona 500 μ mol/L, um inibidor de NADH-desidrogenases alternativas. A adição de 1 mmol/L de flavona inibiu quase totalmente o consumo de oxigênio induzido por NADH exógeno (dados não apresentados).

Figura 06- Avaliação da atividade NADH desidrogenase alternativa em esferoplastos de *P. brasiliensis*. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 3. As adições foram: NADH 2 mmol/L, rotenona 40 μ mol/L, flavona 500 μ mol/L, succinato 10 mmol/L e KCN 1 mmol/L. Os valores entre parênteses indicam a taxa de consumo de oxigênio em η -átomos de oxigênio/min/ 5×10^6 UFC. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

4.1.2- Medidas do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de *P. brasiliensis*

Além da medida do consumo de oxigênio, outro importante parâmetro para se avaliar os processos de fosforilação oxidativa é a medida do potencial de membrana mitocondrial. A intensidade desse potencial é fundamental para promover a síntese de ATP via ATP-sintase (complexo V) e pode refletir o grau de participação mitocondrial na geração de energia para a célula.

A capacidade das mitocôndrias de esferoplastos gerar potencial de membrana foi determinada utilizando-se o corante catiônico safranina O. A titulação do potencial de membrana com KCl na presença de valinomicina foi realizada conforme o item 3.7 e a magnitude do potencial de membrana foi de 130 mV como pode ser observado na figura 7.

Figura 07- Titulação do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de *P. brasiliensis*. As células permeabilizadas foram adicionadas em uma concentração 5×10^6 UFC/mL em tampão para titulação de potencial de membrana. As adições seguintes indicadas pelas setas foram: Substratos (NADH 2 mmol/L ou succinato 10 mmol/L), valinomicina 1 mmol/L e KCl 0,6 mmol/L na primeira adição atingindo 9,2 mmol/L na última adição. Os resultados mostrados são representativos de duas repetições similares e independentes utilizando-se células no final da fase de crescimento exponencial.

A figura 8 mostra o potencial de membrana mitocondrial utilizando-se diferentes substratos oxidáveis e células desde 60 horas até 240 horas de crescimento. Os valores obtidos utilizando-se coquetel de substratos (Tabela 5), NADH ou succinato foram idênticos. Após a estabilização da leitura da fluorescência foi adicionado ADP 2 μ mol, o qual levou a uma pequena diminuição do potencial de membrana (estado 3). A

adição de oligomicina (4 μg) restabeleceu o potencial, que foi completamente dissipado com a posterior adição de FCCP 25 $\mu\text{mol/L}$.

Figura 08- Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em esferoplastos de *P. brasiliensis*. As células permeabilizadas foram adicionadas em uma concentração 5×10^6 UFC/mL em tampão de respiração. As adições indicadas pelas setas foram: Substratos (NADH 2 mmol/L ou succinato 10 mmol/L), ADP 2 μmol , oligomicina 4 μg , FCCP 25 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

Na figura 9 estão demonstrados os resultados representativos de determinações do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, em diferentes tempos da curva de crescimento.

As células utilizadas nos experimentos das figuras 9A e 9B são provenientes de culturas com 60 horas de crescimento e

as figuras 9C, 9D e 9E de 96, 120 e 240 horas, respectivamente.

Na figura 9A está demonstrado o potencial de membrana gerado pela oxidação de substratos do complexo I (Tabela 5). Pode-se observar que este potencial foi menor do que o gerado por succinato e NADH (Figura 8). Entretanto, a associação de NAD^+ aos substratos do complexo I (Figura 9B) causou um aumento do potencial de membrana em relação à utilização destes mesmos substratos sem a adição de NAD^+ . Esse efeito da adição de NAD^+ havia sido observado também nos experimentos de medidas de consumo de oxigênio (Figura 4), causando o aumento no consumo de oxigênio.

Nos ensaios das figuras 9C, 9D e 9E foi utilizado como substratos oxidáveis uma mistura de substratos do complexo I (Tabela 5) e NAD^+ . A intensidade do potencial de membrana gerado com 96 horas (Figura 9C) e 120 horas (Figura 9D) foi equivalente ao potencial gerado com 60 horas (Figura 9B). Enquanto, com 240 horas de crescimento as células apresentaram um potencial menor do que o observado em todos os outros tempos da curva de crescimento. Além disso, esse potencial em 240 horas não foi sensível a adição de ADP 2 $\mu\text{mol/L}$, ao contrário do observado nos demais tempos, nos quais a adição de ADP gerou uma leve diminuição no potencial de membrana (resultados não apresentados).

Em todos os tempos de crescimento da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, o potencial de membrana gerado foi sensível à inibição por adições de rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$ e flavona 500 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, essa sensibilidade foi variável em diferentes tempos da curva de crescimento. A inibição por rotenona, em relação à inibição por flavona, foi maior com 60 horas de crescimento (Figuras 9A e 9B). Enquanto em 96 e 120 horas, a inibição do potencial de membrana por flavona foi maior do que por rotenona (Figuras 9C e 9D). Com 240 horas de crescimento não houve inibição com adições isoladas tanto de rotenona, quanto de flavona, mesmo em duas ou três adições consecutivas. Por outro lado, adições de rotenona e flavona em conjunto foram capazes de inibir o potencial de membrana dessas células com 240 horas de crescimento.

Figura 09- Influência do estágio de crescimento celular sobre o potencial de membrana mitocondrial, na presença de substratos do complexo I e NAD^+ . As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 8. As adições indicadas pelas setas foram: rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$, flavona 500 $\mu\text{mol/L}$ e FCCP 25 $\mu\text{mol/L}$. **A-** células com 60 horas de crescimento energizadas com mistura de substratos de complexo I (tabela 5); **B-** células com 60 horas de crescimento energizadas com mistura de substratos de complexo I e NAD^+ 2 mmol/L; **C, D e E-** células com 96, 120 e 240 horas de crescimento, respectivamente, energizadas com mistura de substratos de complexo I e NAD^+ 2 mmol/L. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

A adição de NAD^+ aumentou significativamente o efeito dos substratos do complexo I, como observado nos resultados de medida de consumo de oxigênio e de potencial de membrana mitocondrial. No entanto, NAD^+ isoladamente também gerou consumo de oxigênio e potencial de membrana. Dessa forma, foi preciso determinar se o efeito de NAD^+ era exercido em NADH desidrogenases alternativas externas ou no complexo I. Com isso, foram realizados experimentos cujos resultados são apresentados na figura 10.

Nas figuras 10A e 10B pode-se observar a influência da presença de NAD^+ e da NADH desidrogenase alternativa externa sobre a oxidação de substratos do complexo I e geração de potencial de membrana.

É esperado que a oxidação de NADH exógeno por NADH desidrogenases alternativas externas libere NAD^+ no meio citosólico, com esse objetivo foram realizados os ensaios cujos resultados estão demonstrados na figura 10A. O potencial de membrana na presença de NADH foi totalmente inibido por flavona 1 mmol/L, demonstrando a inibição da NADH desidrogenase alternativa externa. A posterior adição de substratos do complexo I gerou um potencial de aproximadamente 75 mV, o qual foi totalmente inibido por rotenona (20 $\mu\text{mol/L}$). Interessantemente, estes mesmos substratos sem a adição prévia de NADH e flavona resultou em um potencial de 35 mV (dados não apresentados).

Nos ensaios apresentados na figura 10B ao invés de se adicionar NADH, foi adicionado NAD^+ diretamente. O potencial formado foi totalmente inibido por flavona 1 mmol/L. Em seguida foram adicionados os substratos do complexo I e pôde-se observar a formação de um potencial em torno de 110 mV, que foi totalmente inibido por rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$. Esse potencial é equivalente ao potencial gerado com outros substratos como o succinato e NADH. A adição de flavona 1 mmol/L antes da adição da mistura de NAD^+ e substratos do complexo I também propiciou a formação de um potencial de membrana de 110 mV. Porém, a adição apenas de substratos do complexo I após a adição prévia de flavona gerou um potencial de apenas 35 mV.

Nas figuras 10A e 10B pode-se observar, ainda, que a adição de rotenona antes da adição dos substratos do complexo I inibiu a formação de potencial de membrana pela oxidação destes substratos. Nestas mesmas figuras pode-se notar também que a inibição do complexo I por rotenona e da NADH desidrogenase por flavona não afetou a oxidação de succinato, o qual gerou um potencial que foi inibido por malonato (inibidor da succinato desidrogenase).

A adição de malonato não interferiu no potencial gerado por NAD^+ ou NADH (dados não mostrados).

Para verificar se havia presença de NADH nas soluções de NAD^+ foi realizada uma varredura do espectro de absorção dessas soluções entre 200 nm e 400 nm, as quais apresentaram um pico

de absorção em 260 nm, característico de NAD^+ , e não apresentaram o pico característico de NADH em 340 nm.

Figura 10- Influência de substratos do complexo I e NAD^+ sobre o potencial de membrana, em esferoplastos de *P. brasiliensis*. Foram utilizadas células com 96 ou 120 horas de crescimento. As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 8. As adições indicadas pelas setas foram: NADH 2 mmol/L ou NAD^+ 2 mmol/L, rotenona 20 μ mol/L, flavona 500 μ mol/L, Subst.- mistura de substratos de sítio I (tabela 5), malonato 10 mmol/L e FCCP 25 μ mol/L. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

4.2- Análise da expressão gênica de componentes da cadeia respiratória em leveduras de *P. brasiliensis*, durante sua curva de crescimento

Foram realizados experimentos para determinar o nível de expressão de alguns genes ligados a fosforilação oxidativa. Esses experimentos visaram, principalmente, determinar se as variações observadas na atividade do complexo I e NADH desidrogenase alternativa, assim como, as variações de sensibilidade a rotenona e flavona, estavam ligadas ao nível de expressão de genes relacionados a estas atividades. A expressão do gene da oxidase alternativa também foi avaliada.

O nível de expressão dos genes *aoxPb* (oxidase alternativa), *nd6Pb* (subunidade 6 do complexo I) e *ndhPb* (NADH desidrogenase alternativa), ao longo da fase de crescimento do fungo *P. brasiliensis*, foi determinado utilizando-se quantificação por PCR em tempo real (item 3.11).

Na figura 11 estão apresentados os resultados do nível de expressão do gene *aoxPb*. Pode-se observar, ao longo da fase de crescimento, um aumento gradual do nível de expressão do gene *aoxPb* até 96 horas, em seguida essa expressão diminui atingindo o seu menor nível de expressão em 240 horas de cultivo.

Figura 11- Nível de expressão do gene *aoxPb* em diferentes tempos durante a curva de crescimento do fungo *P. brasiliensis*. A expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão do gene da α -tubulina. Houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre todos os tempos. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

Na figura 12 estão representados os níveis de expressão dos genes *nd6Pb* e *ndhPb*. Apenas nos tempos de 96 e 240 horas o gene *ndhPb* apresentou diferença de expressão significativa, nos quais a expressão de *ndhPb* foi maior do que a expressão do gene *nd6Pb*.

O nível de expressão do gene *nd6Pb* variou ao longo da curva de crescimento do fungo, como pode ser observado na figura 12. Nesta figura pode-se observar o aumento de expressão do gene até 48 horas de cultivo, em seguida, a expressão iniciou uma diminuição gradual atingindo o menor

nível de expressão em 96 horas, quando novamente iniciou um aumento em 120 horas, atingindo o maior nível de expressão em 240 horas de crescimento.

Interessantemente, entre 48 e 120 horas foi observado um comportamento oposto entre a tendência de expressão dos genes *nd6Pb* e *ndhPb*, ou seja, enquanto um gene aumentou o nível de expressão o outro diminuiu.

Figura 12- Nível de expressão dos genes *nd6Pb* e *ndhPb* em diferentes tempos ao longo da curva de crescimento do fungo *P. brasiliensis*. A expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão do gene da α -tubulina. * e # representam diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao tempo T24. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

A figura 13 representa a relação entre o n° de cópias expressas do gene *nd6Pb* e o n° de cópias expressas do gene *ndhPb*. Durante as primeiras 48 horas de cultivo o gene *nd6Pb* é expresso cerca de 3 vezes mais do que o gene *ndhPb*. Após esse período inicial (final da fase lag e primeira metade da fase exponencial, fase log) de crescimento a diferença entre o nível de expressão desses dois genes diminui gradualmente chegando a 96 horas com um número de cópias de *ndhPb* cerca de 20% maior do que o número de cópias do gene *nd6Pb*. Com 120 horas o gene *nd6Pb* é expresso 2 vezes mais do que o gene *ndhPb*, mas com 240 horas os níveis de expressão são os mesmos observados com 96 horas, nos quais a expressão de *ndhPb* é 15% maior do que o gene *nd6Pb*.

Figura 13- Relação entre o nível de expressão dos genes *nd6Pb* e *ndhPb* em diferentes tempos ao longo da curva de crescimento do fungo *P. brasiliensis*. A expressão destes genes foi normalizada pelo gene da α -tubulina. As

diferenças entre os tempos T24 e T48, T72 e T120, T96 e T240 não foram significativas, as comparações entre os demais tempos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

4.3- Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em *P. brasiliensis*

Após avaliar os processos de fosforilação oxidativa na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, iniciamos alguns experimentos relacionados com a conversão de forma de micélio para levedura.

Para isso, avaliamos o efeito de inibidores clássicos de componentes da cadeia respiratória mitocondrial sobre a conversão do fungo *P. brasiliensis* de micélio para levedura. Foram utilizados os inibidores SHAM 2 mmol/L, KCN 1 mmol/L, antimicina A 1,8 $\mu\text{mol/L}$, KCN + SHAM, antimicina + SHAM e rotenona 20 $\mu\text{mol/L}$. As culturas foram fotografadas diariamente e essas imagens estão apresentadas na figura 14. Os resultados com rotenona não estão apresentados, pois não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle.

Nas imagens pode-se observar com 24 horas de incubação, no grupo controle, o aparecimento de estruturas “clamidósporo like”, formações características da diferenciação de micélio para levedura segundo NUNES et al. (2005). Na presença de

inibidores clássicos de oxidases alternativas como propilgalato e SHAM o aparecimento dessas estruturas foi retardado por cerca de 120 horas, mas foram necessárias 240 horas de crescimento para atingir a mesma quantidade de “clamidósporo like” observado no grupo controle com 24 horas.

A adição de cianeto (KCN) inibidor clássico do complexo IV mitocondrial retardou a conversão de forma até 48 horas, enquanto a presença de antimicina A, um inibidor do complexo III atrasou a conversão por até 120 horas.

A utilização de inibidores da oxidase alternativa juntamente com inibidores do complexo III (Antimicina A) ou do complexo IV (cianeto) inibiu totalmente a formação de estruturas “clamidósporo like” até 240 horas. Após esse período as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas em meio PGY por 2 vezes, ressuspensos em meio novo e incubadas a 37°C por mais 240 horas, mesmo assim não foram observadas estruturas características de conversão de forma.

Figura 14- Imagens da conversão micélio/levedura em *P. brasiliensis* na presença de inibidores da cadeia respiratória

Continua na próxima página

Continua na próxima página

4.4- Determinação da produção de EROs em *P. brasiliensis*

Como relatado na introdução deste trabalho, várias vias metabólicas mitocondriais estão relacionadas com o balanço redox das células e conseqüentemente com a geração e prevenção de EROs. Vários autores incluem a oxidase alternativa dentre estas vias preventivas.

Como foi visto em nossos resultados, o gene *aoxPb* tem sua expressão aumentada ao longo da fase de crescimento exponencial e a sua inibição retardou temporariamente a conversão de micélio para levedura. Dessa forma, realizamos alguns ensaios para avaliarmos o estado oxidativo celular e a contribuição da oxidase alternativa em condições de estresse oxidativo.

O perfil de estresse oxidativo celular foi determinado em esferoplastos de *P. brasiliensis* utilizando-se a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA. Os resultados dessas determinações estão representados na figura 15. Pôde-se observar que ao longo do tempo de incubação ocorreu um aumento da fluorescência detectada em todos os grupos, inclusive nos controles. Esse fato demonstra a produção basal de EROs nas células analisadas. O aumento de EROs foi maior quando utilizado inibidores da cadeia respiratória, principalmente antimicina A e rotenona. Na presença desses inibidores a geração de EROs foi cerca de 50% maior do que nas células controle. Não foi possível avaliar o efeito de inibidores da

oxidase alternativa e da NADH desidrogenase alternativa, uma vez que estas drogas interferiram na fluorescência da sonda.

Figura 15- Geração de EROs em células de *P. brasiliensis*. A sonda CM-H₂DCFDA foi utilizada a 5 μ mol/L e os inibidores KCN, antimicina A e rotenona a 1 mmol/L, 1,5 μ mol/L e 2 μ mol/L, respectivamente. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes. *significa diferença significativa $p < 0,05$ em relação às células controle (sem adição de inibidores).

4.5- Drogas indutoras de estresse oxidativo e expressão do gene *aoxPb* em leveduras de *P brasiliensis*

A contribuição da oxidase alternativa em condições de estresse oxidativo foi avaliada utilizando-se drogas conhecidas por induzirem a geração de EROs. O efeito destas drogas indutoras de estresse oxidativo sobre a expressão do

gene *aoxPb* foi quantificada por PCR quantitativo em tempo real.

Os resultados desses ensaios estão demonstrados na figura 16, na qual pode-se observar o aumento significativo no nível de expressão do gene *aoxPb* em função dos tratamentos com H_2O_2 , menadiona, menadiona + NPS, rotenona, rotenona + KCN e antimicina A. Os demais tratamentos não causaram alterações significativas na expressão do gene.

Figura 16- Aumento no nível de expressão do gene *aoxPb* em função de drogas geradoras de estresse oxidativo. A expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão do gene da α -tubulina e após normalizada foi dividida pela expressão das células controle. Os resultados demonstrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes. * significa diferença significativa $p < 0,05$ em relação às células controle (sem adição de inibidores).

4.6- Estudos moleculares e de atividade da oxidase alternativa e de seu gene *aoxPb*

4.6.1- Extração de DNA da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*

Visando o entendimento dos mecanismos de regulação e funções da oxidase alternativa em fungos dimórficos, como o *P. brasiliensis*, iniciamos estudos moleculares envolvendo a clonagem e a expressão heteróloga do gene *aoxPb*.

Neste contexto, o isolamento de DNA genômico, íntegro, de *P. brasiliensis* é um fator determinante para a obtenção de fragmentos de DNA a partir de técnicas de amplificação por PCR. Na extração do DNA a ação de DNases e a conseqüente quebra do DNA genômico foi prevenida com a adição de proteinase K, além do cuidado especial em evitar-se a presença de umidade na massa celular. A adoção desses cuidados foi fundamental para o isolamento do DNA íntegro.

Na figura 17 pode-se observar a integridade (sem presença de arraste) do DNA genômico isolado. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm obtendo-se um valor de 747 µg/mL e sua pureza foi determinada pela relação entre as absorbâncias em 260 nm e 280 nm $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$.

Figura 17- DNA extraído por disrupção mecânica da parede celular da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. Fotografia em negativo de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE. **M**- Marcador Lambda *HindIII* + *EcoRI* (Promega) **1**- DNA Genômico de *P. brasiliensis*.

4.6.2- Amplificação do gene *aoxPb* a partir de DNA genômico

O DNA genômico de *P. brasiliensis* e os *primers* AoxF1 e AoxR1 (Tabela 4) foram utilizados na amplificação do gene *aoxPb* por PCR. A obtenção da sequência genômica do gene *aoxPb* possibilitou a identificação de um intron através da análise comparativa com o clone *aoxPb* de cDNA, contig PbCC006-F12 (Anexo A). Utilizando-se os *primers* AoxF1 e AoxR1 com DNA genômico ou com o clone de cDNA como DNA molde, foi possível amplificar um fragmento único de aproximadamente 1.100 pb (Figura 18), tamanho esperado utilizando-se estas combinações de *primers*.

Figura 18- Amplificação do gene *aoxPb* por reações de PCR a partir de DNA genômico e cDNA. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE. **M**- Marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) **1**- amplificação a partir de cDNA; **2**- amplificação a partir de DNA genômico.

O fragmento amplificado nas reações de PCR, utilizando-se DNA genômico e *primers* AoxF1 e AoxR1 mostrado na figura 18, foi purificado e clonado no plasmídio PCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen). Esses plasmídeos foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5- α ou XL1-Blue, em seguida foram isolados e a presença do inserto confirmada por digestão com enzima de restrição *EcoRI* e análise por eletroforese. Os plasmídeos contendo inserto do tamanho esperado foram novamente isolados utilizando-se um sistema de coluna de cromatografia por troca iônica (Qiagen). Após este segundo isolamento obteve-se uma maior concentração de plasmídeos

isolados, assim como, uma maior pureza para que estes fossem seqüenciados.

4.6.3- Análises da seqüência do gene *aoxPb* e da proteína deduzida

A seqüência de nucleotídeos do gene *aoxPb* amplificada a partir de DNA genômico foi alinhada à seqüência de cDNA utilizando-se um programa de alinhamento múltiplo (clustal W) sob o algoritmo de Thompson et al., (1994), disponível na página <http://workbench.sdsc.edu>. O alinhamento revelou a presença de uma ORF de 1.059 pb e de um intron de 77 pb entre os nucleotídeos 262 e 339, além de uma região 5'UTR de 138 pb e uma região 3'UTR de 547 pb. Foram identificados também neste clone os códons de iniciação (ATG) e o códon de parada (TAA) (Figura 19).

O produto de tradução primário deduzido a partir da seqüência de nucleotídeos apresentou 360 aminoácidos e um peso molecular calculado de 40,3 kDa com um ponto isoelétrico (PI) calculado de 9,25. Foram utilizados para estas análises os programas "Isoelectric Point Determination" (PI) e "Extinction Coefficient Calculation" (EXTCOEF baseado em Gill & Hipple, 1989) disponíveis na página <http://workbench.sdsc.edu>. A análise de hidropaticidade da seqüência de aminoácidos deduzida foi realizada utilizando-se o programa GREASE (baseado no algoritmo de Kyte & Doolittle, 1982) disponível

na página <http://workbench.sdsc.edu>. Essa análise revelou um perfil bastante similar a outras oxidases alternativas (AOXs), com a presença de duas regiões hidrofóbicas indicadas pelos números 1 e 2 (figura 20). A primeira região hidrofóbica estende-se do aminoácido W₁₄₇ até o aminoácido R₁₆₉ e a outra da posição W₂₀₉ até L₂₃₁, estas regiões estão sublinhadas na figura 19. Além disso, a partir de um alinhamento com outras AOXs foram identificados seis possíveis sítios de ligação a metal ("metal-binding site") nas respectivas posições E₁₅₅, E₁₉₄, H₁₉₇, E₂₄₅, E₃₀₀ e H₃₀₃, além de dois possíveis sítios de ligação a Ubiquinona ("Ubiquinone-binding site") Y₂₃₀ e Y₂₅₂ que estão demonstrados nas figuras 19 e 21.

O alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos de AOXs de diferentes espécies *H. capsulatum*, *N. crassa*, *C. albicans* e *T. brucei brucei* (números de acesso no Genbank AF133236, AY140653, AF116872 e TBU52964, respectivamente) com a AoxPb revelou os seguintes valores de identidade 72%, 46%, 40% e 29%, respectivamente. O alinhamento das quatro principais regiões conservadas dentre as Aox_s LET, NERMHL, LEEEA e RADE-H está demonstrado na figura 21.

```

-138 cactctatcccttctttggaagctgaaaaagataataataagctgttacctaccatatca -79
-78 caatatcacctgtcttcatcaagaatttggcctgaatcaaagccttttgagaaacgtagt -19
-18 ttcacccctctgctcgccatgtatccgatctccgcaggacccatgagaacctttgttctc 42
1 M Y P I S A G P M R T F V L 14
43 tcccgtctgctcgtccatactgctggtcattcggatcaatcaactgctctttccaga 102
15 S R S A S S I L R G S F G Q S T A L S R 34
103 ggtctccagtgtagtagtcctctgctttactataacattgcccttgggagcaagaggtgc 162
35 G L Q C S S P L L Y Y N I A L G S K R C 54
163 ttctcagcaggtccccgccaacgagccaaagaatatttcccagccctcagtggaacaaaa 222
55 F S A G P R Q R A K E Y F P A L S G T K 74
223 catattgtcagtgctgaaacaacatgggcacatccaatgtgtgctgttgggtcacacac 282
75 H I V E S E T T W A H P M F 88
283 aaccgtgctctgccccgctttgtctgagatatataaccataaacccaattgtagtca 342
T 89
343 ccgaagagcagatgaagagtattgtcatcgcacatcgaaatgctgagacctgggtccgatt 402
90 E E Q M K S I V I A H R N A E T W S D W 109
403 gggttgccttggaacggttcgtatgttgctggtgggtacagatctggcaacagggttaca 462
110 V A L G T V R M L R W A T D L A T G Y K 129
463 aacatcccggaagtcggaccagaatgagcaatttgttatgactgagaagaaatggatca 522
130 H P G K S D Q N E Q F V M T E K K W I I 149
523 tccggttcattttctagaaacggttgctggtgtccctggaatggttggaggtatgctcc 582
150 R F I F L E# T V A G V P G M V G G M L R 169
583 gccatctccgaagcctaagacgaatgaagcgggataatggatggatcgaaactcttttag 642
170 H L R S L R R M K R D N G W I E T L L E 189
643 aagaagcatacaacgagagaatgcacctgctgtcattcctgaaactcgctaaaccagggt 702
190 E A Y N E# R M H# L L S F L K L A K P G W 209
703 ggtttatgctgctcatggttttaggagcccagggtgtcttcttcaactctttcttcatgg 762
210 F M R L M V L G A Q G V F F N S F F M A 229
763 catacctcatctcccccgacctgccaccgcttcgtcgggtacctcgaagaggaggctg 822
230 Ys L I S P R T C H R F V G Y L E# E E A V 249
823 ttatgacgtacacacagcaattaacgacctcgaagctgggaagttgctgagtgaggcca 882
250 M T Ys T H A I N D L E A G K L P E W A N 269
883 acaaagaggctccagatattgccgtggcttactggcacatgccagaaaacaagagaacca 942
270 K E A P D I A V A Y W H M P E N K R T I 289
943 ttctggacttgctgtactatatccgtgccgatgaagctaagcattgtgaggtcaaccaca 1002
290 L D L L Y Y I R A D E# A K H# C E V N H T 309
1003 ccctggccaacttgaagcccaacgtcgatccaaatccttatacctcgaagtacgataacc 1062
310 L A N L K P N V D P N P Y T S K Y D N P 329
1063 ccgatgtgctcatccaacgaagacagccgagataatcaaaccactggctgggaaagaa 1122
330 D V P H P T K T A E I I K P T G W E R K 349
1123 aggatgtcatctaaaatggacaaggaaccctttcaaatgctgaattaacgtcaacctctt 1182
350 D V I * 352
1183 atcaatccttcgacatatatttcgccagggtgggggttaccagcactgacctttcttgct 1242
1243 ttgtgatttcgtttgtcgagccttgaagaagacaccactctgataccccgtctccatatc 1302
1303 ctttccactcaaaattacatacaaaaaaacagactaaatcataaaaatgcataattggcg 1362
1363 ggggtggtttgggcatagcggatggcgttgttttcttttgccttgggtgtctct 1422
1423 cctgttgtgtcttgcatagtcagttaaacggagtttctaatttatttaccatccgcattct 1482
1483 ttaatttcacttttccgtccgtcatttgttttaagtttgttctgcttgtaaatccgtt 1542
1543 tgtctgtttaattgacattcgtgggatgggaaaccattatgcggacatgtttgctgttca 1602
1603 agtgacttttgttttagaagagaatgaagtttgtttcaaatgcattccaaaggagtaa 1662
1663 taatctaattgtccaaccaa 1681

```

Figura 19– Sequência nucleotídica do gene *aoxPb*, aminoácidos deduzidos e principais aminoácidos ligados aos sítios de atividade enzimática. A posição dos nucleotídeos está

representada por números em fonte normal e os aminoácidos por números *itálicos*. A região do intron está sublinhada e as regiões trans-membrana estão duplo-sublinhadas. Os códons de iniciação (ATG) e de parada (TAA) estão em **negrito** e os possíveis aminoácidos de ligação a metais e à ubiquinona estão marcados respectivamente com # e \$.

Figura 20- Análise comparativa da hidropaticidade de seqüências de aminoácidos deduzidas de genes da oxidase alternativa (I- Aox *P. brasiliensis*, II- Aox *H. capsulatus*, III- Aox *C. albicans*, IV- Aox *N. crassa* e V- Aox *T. brucei brucei*). Os números 1 e 2 representam as duas regiões hidrofóbicas (possivelmente trans-membrana) das enzimas representadas.

Figura 21- Alinhamento das quatro principais regiões conservadas dentre as Aox. 1-LET, 2-NERMHL, 3-LEEEA e 4-RADE-H. As regiões mais conservadas entre as proteínas estão enquadradas em preto. Os possíveis sítios de ligação a metais estão indicados #, e os prováveis sítios de ligação a ubiquinona estão indicados por símbolos S.

4.6.4- Expressão heteróloga do gene *aoxPb* em *E. coli*

Inicialmente a expressão heteróloga do gene *aoxPb* em bactérias visava a obtenção e purificação de grande quantidade da enzima AOX_{Pb} para produção de anticorpos anti-AOX_{Pb} e estudos de cristalografia. No entanto, esses objetivos não foram bem sucedidos em função do caráter apolar e baixa hidrosolubilidade da enzima AOX_{Pb}. Por outro lado, durante os

experimentos de expressão em *E. coli*, foram obtidos outros resultados relativos a atividade e processamento pós traducional da enzima AOX Pb , esses resultados serão abordados posteriormente.

Para a expressão heteróloga em *E. coli*, foi escolhida a cepa Rosetta™ (DE3)pLysS, por ser uma cepa muito utilizada e descrita para esta finalidade. O gene *aoxPb* foi amplificado por PCR a partir de cDNA utilizadondo-se os pares de *primers* AoxF1/AoxR1 e AoxF2/AoxR2 (Tabela 4). Estes *primers* foram desenhados para adição de sítios de restrição no gene *aoxPb* e posterior clonagem no plasmídeo pET-28a(+).

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, purificados do gel e clonados em plasmídeos PCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). Esses plasmídeos foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5- α ou XL1-Blue, em seguida foram isolados, digeridos e seqüenciados.

Clones, que não apresentaram mutações de nucleotídeos, foram selecionados para a clonagem de seus insertos (*aoxPb*) nos plasmídeos de expressão pET-28a(+). Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição e as digestões foram submetidas à eletroforese. Em seguida o gene *aoxPb* liberado pela digestão foi extraído do gel e ligado aos plasmídeos de expressão pela enzima de ligação T4 DNA Ligase.

A análise da clonagem nos plasmídeos de expressão foi

realizada de forma idêntica à análise das clonagens em PCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) apresentadas anteriormente.

Os plasmídeos selecionados foram denominados PET28aoxPb, que expressa o gene *aoxPb* sem caudas de histidina, e PET28aoxPbCT, que expressa o gene *aoxPb* com cauda de histidina na porção carboxi terminal da proteína. Estes plasmídeos foram transformados em *E. coli* Rosetta[™] (DE3)pLysS e a indução, em pequena escala, da expressão do gene *aoxPb* foi realizada. As amostras induzidas e não induzidas foram coletadas e a concentração de proteínas foi determinada. As concentrações dessas amostras foram normalizadas e submetidas à eletroforese SDS-PAGE com aplicação no gel de 5 µg de proteínas por poço. A fotografia desta eletroforese pode ser visualizada na figura 22. Nas colunas 2 e 4 pode-se observar a presença de duas bandas mais intensas. Essas amostras eram provenientes de culturas cuja expressão dos plasmídeos PET28aoxPb e PET28aoxPbCT foi induzida por IPTG 0,5 mmol/L por 6 horas. O peso molecular dessas bandas correspondem com o esperado para o produto de expressão heteróloga AOX**Pb** (Figura 23) e AOX**PbCT** (Figura 24), respectivamente 40 kDa e 42 kDa. Nas amostras cuja expressão não foi induzida (colunas 1 e 3) não foi observado aumento de nenhuma banda com peso molecular próximo ao observado nas amostras induzidas (colunas 2 e 4).

O peso observado por SDS-PAGE tanto para AOX*Pb*, quanto AOX*PbCT* indica que o peptídeo sinal presente na região amino-terminal da oxidase alternativa não foi clivado em *E. coli*.

Figura 22- Fotografia de SDS-PAGE com proteínas presentes em amostras coletadas de *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. **1-** amostras transformadas com PET28aox*PbCT* cuja expressão não foi induzida; **2-** amostras transformadas com PET28aox*PbCT* cuja expressão foi induzida; **3-** amostras transformadas com PET28aox*Pb* cuja expressão não foi induzida; **4-** amostras transformadas com PET28aox*PbCT* cuja expressão foi induzida.

pET28aoxPb:

MDPISAGPMRTFVLRSASSILRGSEFGQSTALSRLQCSSPLLYYNIALGSKRCFSAGPRQRAKEYFP
 ALSGTXHIVESETTWAHPMFTEEQMKSIVIAHRNAETWSDWVALGTVRMLRWATDLATGYKHGPKSDQ
 NEQFVMTEKKWIIRFIFLETVAGVPGMVGGMLRHLRSLRRMKRDNGWIETLLEEAYNERMHLLSFLKL
 AKPGWFMRLMVLGAQGVFFNSFFMAYLISPRTCHRFVGYLEEEAVMTYTHAINDLEAGKLPWANKEA
 PDIAVAYWHMPENKRTILDLLYYIRADEAKHCEVNHTLANLKPNDPNPYTSKYDNPDPVPHPTKTAEI
 IKPTGWERKDVII

Ponto isoelétrico: 9.125000

Nº de aminoácidos: 352

Peso molecular: 40.266,6 Daltons

Figura 23–Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pET28aoxPb. Os aminoácidos sublinhados constituem um possível peptídeo sinal predito de acordo com BENDTSEN, et al. (2004) (Anexo F). Em negrito está indicado um aminoácido mutado com a inserção do sítio de restrição para a enzima *NcoI*.

pET28aoxPbCT:

MDPISAGPMRTFVLRSASSILRGSEFGQSTALSRLQCSSPLLYYNIALGSKRCFSAGPRQRAKEYFP
 ALSGTXHIVESETTWAHPMFTEEQMKSIVIAHRNAETWSDWVALGTVRMLRWATDLATGYKHGPKSDQ
 NEQFVMTEKKWIIRFIFLETVAGVPGMVGGMLRHLRSLRRMKRDNGWIETLLEEAYNERMHLLSFLKL
 AKPGWFMRLMVLGAQGVFFNSFFMAYLISPRTCHRFVGYLEEEAVMTYTHAINDLEAGKLPWANKEA
 PDIAVAYWHMPENKRTILDLLYYIRADEAKHCEVNHTLANLKPNDPNPYTSKYDNPDPVPHPTKTAEI
 IKPTGWERKNSSSVDKLAAALEHHHHHH

Nº de aminoácidos:368

Peso molecular: 42.048,54 Daltons

Figura 24–Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pET28aoxPbCT. Os aminoácidos sublinhados constituem um possível peptídeo sinal predito de acordo com BENDTSEN, et al. (2004) (Anexo F). Em negrito está indicada a cauda de histidinas acrescentada pelo plasmídio de expressão.

4.6.5- Imunodetecção de AOXPb com anticorpo anti-cauda de histidinas

Para verificar se a banda de 42 kDa, observada por SDS-PAGE era o produto de expressão a partir do plasmídeo PET28aoxPbCT, foram realizados experimentos utilizando anticorpos anti-cauda de histidinas. Dessa forma, a marcação de uma banda única próximo de 42 kDa esclareceria esta dúvida.

A imunodetecção pode ser visualizada na figura 24, na qual se pode observar a marcação intensa de uma banda em torno de 42 kDa na amostra 2 proveniente de bactérias transformadas com pET28aoxPbCT. Essa marcação em torno de 42 kDa não foi observada na amostra 1 cuja expressão não foi induzida, assim como, nas amostras 3 e 4 provenientes, respectivamente, de bactérias transformadas com pET28aoxPb não induzida e induzida. Esses resultados indicam que a expressão da proteína alvo AOXPb-CT pela cepa *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/pET28aoxPbCT estava ocorrendo. Os anticorpos marcaram especificamente as proteínas com cauda de histidina, uma vez que as amostras não induzidas ou com AOXPb sem cauda de histidina não foram marcadas.

Figura 25– Fotografia de Western Blot realizado para a detecção da AOXPbCT expressa com cauda de histidina. **1**– amostra transformada com PET28aoxPbCT cuja expressão não foi induzida; **2**– amostra transformada com PET28aoxPbCT cuja expressão foi induzida; **3**– amostra transformada com PET28aoxPb cuja expressão não foi induzida; **4**– amostras transformadas com PET28aoxPbCT cuja expressão foi induzida.

4.6.6– Avaliação da atividade oxidase alternativa em *E. coli*

Após a confirmação da expressão da proteína AOXPbCT, foram realizados ensaios de medida de consumo de oxigênio, para avaliar a atividade heteróloga da oxidase alternativa.

As células bacterianas de *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS, *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/pET-28a(+), *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/pET28aoxPb e *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/pET28aoxPbCT induzida e não induzida foram analisadas em um oxígrafo e o consumo de oxigênio destas células foi determinado em $90,5 \pm 3,6$ η átomos de oxigênio/min/mg de proteína. A adição de KCN inibiu quase totalmente (94%) o consumo de oxigênio das células, demonstrando que estas não apresentavam respiração resistente a cianeto decorrente de uma

atividade de oxidase alternativa (Figura 26). A adição de SHAM não alterou a taxa de consumo de oxigênio nessas células (dados não apresentados).

Figura 26- Inibição do consumo de oxigênio em *E. coli* pela adição de KCN. Os experimentos foram realizados em meio de cultura LB. Os valores de consumo de oxigênio, em n átomos de oxigênio/min/mg de proteína, estão indicados entre parênteses. Foram utilizadas células de *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS, *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS/pET-28a(+), *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS/ pET28aoxPbCT induzidas e não induzidas e *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS/pET28aoxPb não induzidas. Os resultados são representativos de três experimentos similares e independentes.

Na figura 26 estão demonstrados os resultados de ensaios realizados com *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS/pET28aoxPb induzidas. Nessas condições as células bacterianas apresentaram consumo de oxigênio resistente a cianeto (KCN) e

sensível a SHAM (Figuras 26A e 26B), cianeto inibiu apenas 60% do consumo de oxigênio e a adição de SHAM antes de KCN inibiu 34% do consumo de oxigênio.

Figura 27- Consumo de oxigênio resistente a KCN ou antimicina A e sensível a SHAM, em *E. coli*. Os experimentos foram realizados em meio de cultura LB. Os valores de consumo de oxigênio estão indicados entre parênteses. Foram utilizadas células de *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/pET28aoxPb induzidas. Os resultados são representativos de três experimentos similares e independentes.

Os resultados ilustrados graficamente nas figuras 26 e 27 estão apresentados numericamente, em valores percentuais, na tabela 6.

Tabela 06- Efeito da expressão heteróloga do gene *aoxPb* sobre o consumo de oxigênio em *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS

<i>Cepa</i>	^a Velocidade de respiração (sem inibidores)	Resistência a KCN (1 mmol/L) (%)	Sensibilidade a SHAM (2,5 mmol/L) (%)	Resistência a KCN + SHAM (%)
<i>E.coli</i>	90,5 ± 3,8	7,9	0	n.r
<i>E.coli</i> / pET28aoxPb	104,8 ± 4,3	40,5	33,4	13,7

As condições experimentais estão descritas na legenda das figuras 26 e 27.

^a η átomos de oxigênio por min por mg de proteína.

^b Média ± S.E.M. Valores de 3 determinações.

^c Não realizado.

(%) expressa valores relativos.

4.6.7- Expressão heteróloga do gene *aoxPb* em *S. cerevisiae*

4.6.7.1- Amplificação do gene *aoxPb* e clonagem em plasmídeos de expressão pYES2 e pYES2-NCT

O fungo *S. cerevisiae* foi escolhido como modelo de organismo eucariótico para expressão heteróloga do gene *aoxPb*. Essa escolha foi baseada, principalmente, no fato deste fungo não apresentar nenhum gene de oxidase alternativa.

Para a expressão em *S. cerevisiae* o gene *aoxPb* foi amplificado por PCR a partir de cDNA, utilizando-se os pares de primers AoxYES1/AoxYES2 e AoxYES3/AoxYES4 (Tabela 4).

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram purificados e clonados em plasmídeos PCR[®]2.1-TOPO[®]

(Invitrogen). Esses plasmídeos foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5- α ou XL1-Blue, em seguida foram isolados, digeridos e seqüenciados.

Clones que não apresentaram mutações de nucleotídeos foram selecionados para a clonagem de seus insertos (*aoxPb* ou *aoxPbNCT*) nos plasmídeos de expressão pYES2 e pYES2-NCT. Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição e submetidos à eletroforese. Em seguida o inserto (gene *aoxPb* digerido) foi extraído do gel e ligado aos plasmídeos de expressão pela enzima de ligação T4 DNA Ligase.

A análise da clonagem nos plasmídeos de expressão foi realizada de forma idêntica à análise das clonagens em PCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) apresentadas anteriormente.

Após seqüenciamento, dois clones que revelaram fase de leitura correta entre o inserto *aoxPb* e a região promotora dos plasmídeos, foram selecionados para os experimentos de expressão em levedura. Os clones selecionados foram denominados pYES*aoxPb* (expressa a proteína AOX*Pb* sem cauda de histidinas) e pYES*aoxPbNCT* (expressa a proteína AOX*Pb* com uma cauda de histidinas na porção amino-terminal e outra na porção carboxi-terminal).

Os plasmídeos pYES*aoxPb* e pYES*aoxPbNCT* foram transformados em *S. cerevisiae* INVSc1 e a indução, em pequena escala, da expressão do gene *aoxPb* foi realizada. As amostras induzidas e não induzidas foram coletadas e preparadas para a

análise por SDS-PAGE. Os precipitados e sobrenadantes dessa etapa foram submetidos à eletroforese, mas não foi possível observar nenhum aumento de expressão (intensidade de alguma banda entre 37 e 48 kDa). Os produtos de expressão poderiam ter 37 ou 40 kDa referentes aos produtos de expressão heteróloga AOX_{Pb} (Figura 28), sem o peptídeo sinal ou com o peptídeo sinal, ou ainda, 42 kDa e 48 kDa referentes aos produtos de expressão heteróloga AOX_{Pb}-NCT (Figura 29), sem o peptídeo sinal ou com o peptídeo sinal. Também não foram observadas diferenças entre as amostras induzidas e não induzidas de *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaox_{Pb}.

pYESaox_{Pb}:

MDPISAGPMRTFVLSRSASSILRGSFGQSTALSRLQCSSLYYNIALGSKRCFSAGPRQRAKEYFP
 ALSGTXHIVESETTWAHPMFTEEQMKSIVIAHRNAETWSDWVALGTVRMLRWATDLATGYKHGPKSDQ
 NEQFVMTEKKWIIRFIFLETVAGVPGMVGGMLRHLRSLRRMKRDNGWIETLLEEAYNERMHLLSFLKL
 AKPGWFMRLMVLGAQGVFFNSFFMAYLISPRCHRFVGYLEEEAVMTYTHAINDLEAGKLPWANKEA
 PDIAVAYWHMPENKRTILDLLYYIRADEAKHCEVNHTLANLKPNDPNFYTSKYDNPDPVPHPTKTAEI
 IKPTGWERKDVII

Ponto isoelétrico: 9.125000

Nº de aminoácidos: 352

Peso molecular: 40.266,6 Daltons

Figura 28- Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pYESaox_{Pb}. Os aminoácidos sublinhados constituem um possível peptídeo sinal predito de acordo com BENDTSEN, et al. (2004).

A**pYESaoxPbNCT:**

MGG**SHHHHHH**GMASMTGGQOMGRDLYDDDDKVPGSAGPMRTFVLSRSASSILRGSEFGQSTALSRGLQC
 SSPLLYYNIALGSKRCFSAGPRQRAKEYFPALSGTKHIVESETTWAHPMFTEEOMKSIVIAHRNAETW
 SDWVALGTVRMLRWATDLATGYKHFGKSDQNEQFVMTEKKWIIRFIFLETVAGVPGMVGGMLRHLRSL
 RRMKRDNGWIETLLEEAYNERMHLLSFLKLAKPGWFMRLMVLGAQGVFFNSFFMAYLISPRTCHRFVG
 YLEEEAVMTYTHAINDLEAGKLPWANKEAPDIAYAYWHMPENKRTILDLLYYIRADEAKHCEVNHTL
 ANLKPNVDPNPYTSKYDNPDPVPHPTKTAEIIKPTGWERKDEFCRYPAQWRPLESRGPFEGKPIPNPLL
 GLDSTRTG**HHHHHH**

Nº de aminoácidos:422

Peso molecular:48.171,66 Daltons

B**pYESaoxPbNCT sem peptídeo sinal:**

QSTALSRGLQCSSPLLYYNIALGSKRCFSAGPRQRAKEYFPALSGTKHIVESETTWAHPMFTEEOMKS
 IVIAHRNAETWSDWVALGTVRMLRWATDLATGYKHFGKSDQNEQFVMTEKKWIIRFIFLETVAGVPGM
 VGGMLRHLRSLRRMKRDNGWIETLLEEAYNERMHLLSFLKLAKPGWFMRLMVLGAQGVFFNSFFMAYL
 ISPRTCHRFVGYLEEEAVMTYTHAINDLEAGKLPWANKEAPDIAYAYWHMPENKRTILDLLYYIRAD
 EAKHCEVNHTLANLKPNVDPNPYTSKYDNPDPVPHPTKTAEIIKPTGWERKDEFCRYPAQWRPLESRG
 FEGKPIPNPLLGLDSTRTG**HHHHHH**

Nº de aminoácidos:365

Peso molecular: 42.122,55 Daltons

Figura 29- Seqüência de aminoácidos deduzidos a partir do plasmídeo pYESaoxPbNCT. A- Os aminoácidos sublinhados constituem um possível peptídeo sinal predito de acordo com BENDTSEN, et al. (2004), assim como, alguns aminoácidos acrescentados pelo plasmídeo de expressão. Em negrito estão representadas as caudas de histidinas acrescentadas pelo plasmídeo de expressão nas extremidades amino e carboxi terminal; B- Seqüência de aminoácidos sem o peptídeo sinal.

4.6.7.2- Imunodetecção de AOXPb com anticorpo anti-cauda de histidinas

Como a expressão heteróloga do gene *aoxPb* não foi evidenciada por SDS-PAGE, foram realizados experimentos com anticorpos anti-cauda de histidinas afim de se detectar a proteína AOXPb.

Amostras de proteínas mitocondriais de *S. cerevisiae* INVSc1 transformadas com pYES2 e pYESaoxPbNCT foram submetidas a separação por SDS-PAGE. Após separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com anticorpos anti-HistTag. A imunodetecção pode ser visualizada na figura 30, na qual se pôde observar na amostra 2 a marcação de uma banda em torno de 40 kDa e outra em torno de 48 kDa, pesos correspondentes ao produto de expressão AOXPb-NCT sem o peptídeo sinal e com o peptídeo sinal, respectivamente. Na amostra 1 proveniente de leveduras transformadas com o plasmídeo pYES2 sem inserto, não foi observada nenhuma marcação.

Figura 30- Fotografia de Western Blot realizado para a detecção da proteína AOX_{Pb}-NCT expressa em *S. cerevisiae*. Em todas as amostras foram utilizados 50 µg de proteínas mitocondriais

4.6.7.2- Avaliação da atividade oxidase alternativa em *S. cerevisiae*

Depois de confirmada a expressão da proteína AOX_{Pb} por “Western blot”, foram realizados experimentos de medida de consumo de oxigênio a fim de se determinar a atividade da oxidase alternativa heteróloga.

As medidas de consumo de oxigênio e desafios com inibidores da cadeia respiratória mitocondrial foram realizados com as cepas de *S. cerevisiae* INVSc1, *S. cerevisiae* INVSc1/pYES2, *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPb e *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPbNCT. As células controle, *S. cerevisiae* INVSc1 e *S. cerevisiae* INVSc1/pYES2, assim como as células INVSc1/pYESaoxPbNCT, não apresentaram respiração resistente a cianeto (figura 31). Por outro lado, as leveduras transformadas com o plasmídeo pYESaoxPb foram resistentes à

adição de KCN e sensíveis à adição de SHAM ou BHAM, inibidores específicos da oxidase alternativa (figuras 32A e 32B), os valores relativos da resistência a KCN e da sensibilidade a SHAM são mostrados na tabela 7.

Figura 31- Inibição do consumo de oxigênio pela adição de KCN em *S. cerevisiae*. Os experimentos foram realizados em meio de cultura SC. Foram utilizadas células de *S. cerevisiae* INVSc1, *S. cerevisiae* INVSc1/pYES2 e *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPbNCT. Os valores entre parênteses representam a velocidade de consumo de oxigênio em η átomos de oxigênio por min por 9×10^6 UFC. Os resultados são representativos de três experimentos similares e independentes.

Figura 32- Consumo de oxigênio resistente a KCN em *S. cerevisiae*. Os experimentos foram realizados em meio de cultura SC. Foram utilizadas células de *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPb. Os valores entre parênteses representam a velocidade de consumo de oxigênio em η átomos de oxigênio por min por 9×10^6 UFC. Os resultados são representativos de três experimentos similares e independentes.

Os resultados ilustrados graficamente nas figuras 30 e 31 estão apresentados numericamente, em valores percentuais, na tabela 7.

Tabela 07- Efeito da expressão heteróloga do gene *aoxPb* sobre o consumo de oxigênio, em *S. cerevisiae*

<i>Cepa</i>	^a Velocidade de respiração (sem inibidores)	Resistência a KCN (1 mmol/L) (%)	Sensibilidade a SHAM (2.5 mmol/L) (%)	Resistência a KCN + SHAM (%)
<i>SC</i>	46,3 ± 2,5 ^b	5,6	0	^c n.r.
<i>SC/pYES2</i> ou <i>SC/pYESaoxPb</i> -NCT	45,5 ± 1,6	7,1	0	n.r.
<i>SC/pYESaoxPb</i>	35,6 ± 2,1	61,9	34,3	8,1

As condições experimentais estão descritas na legenda das figuras 31 e 32.

^a η átomos por min por 9×10^6 células.

^b Média ± S.E.M. Valores de 3 determinações.

^c Não realizado.

(%) expressa valores relativos.

4.6.7.3- Influência da Aox no crescimento de *S. cerevisiae*

Evidenciada a expressão heteróloga e a atividade da oxidase alternativa de *P. brasiliensis* em *S. cerevisiae*, foram realizados ensaios para determinar o efeito dessa atividade oxidase alternativa sobre as células e o desenvolvimento de *S. cerevisiae*.

Foi observado que a atividade oxidase alternativa diminuiu o crescimento das células de *S. cerevisiae*, como pode ser observado nas figuras 32A e 33B. Estas figuras representam a curva de crescimento de *S. cerevisiae*, expressando ou não o

gene *aoxPb*, em meio de cultura fermentativo e não fermentativo, respectivamente. Alíquotas das culturas foram retiradas ao longo de 72 horas de crescimento e a densidade óptica determinada em espectrofotômetro em 600 nm. Quando a leitura atingiu 1 unidade de densidade óptica as amostras foram diluídas para que as leituras permanecessem entre 0,2 e 0,8. Esses valores foram então corrigidos pelo fator de diluição.

Em ambos os meios o crescimento das células INVSc-pYES2/*aoxPb* foi menor do que das células INVSc-pYES2, demonstrando a interferência da atividade oxidase alternativa sobre a multiplicação celular.

Figura 33- Curva de crescimento das células de *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPb e *S. cerevisiae* INVSc1/pYES2. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes.

4.6.7.3- Determinação da produção de EROs em *S. cerevisiae*

Conforme relatado anteriormente, uma das possíveis hipóteses é que a atividade oxidase alternativa previne a geração de EROs em determinadas situações. Como os inibidores da oxidase alternativa interferiram com a fluorescência da sonda utilizada na determinação de EROs, não foi possível avaliar a participação da oxidase alternativa no estado oxidativo de células de *P. brasiliensis*. Dessa forma, a avaliação dessa atividade em *S. cerevisiae* expressando a oxidase alternativa pode ser de grande utilidade para o entendimento do papel dessa enzima.

A influência da expressão do gene *aoxPb* sobre o perfil de estresse oxidativo celular foi avaliada utilizando-se a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA, cuja oxidação é proporcional ao aumento de fluorescência detectado e à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os resultados estão representados na figura 34, na qual se pode observar o aumento na geração de EROs ao longo do tempo. Esse aumento foi menor (cerca de 15%) nas células que expressavam o gene *aoxPb* tanto nas células controle quanto nas tratadas com inibidores da cadeia respiratória. No entanto, a expressão do gene *aoxPb* não foi capaz de prevenir o aumento na geração de EROs ao longo do tempo na presença de antimicina A. Como pode ser visto, desde 10 minutos de tratamento, tanto as células *S. cerevisiae*

INVSc1/pYES2 quanto *S. cerevisiae* INVSc1/pYESaoxPb tiveram um grande aumento de EROs na presença desse inibidor, mesmo assim nas células INVSc1/pYESaoxPb esse aumento foi menor em relação às células INVSc1/pYES2.

Figura 34- Influência da expressão do gene *aoxPb* na geração de EROs em células de *S. cerevisiae*. A sonda CM-H₂DCFDA foi utilizada a 5 μ mol/L e os inibidores KCN e antimicina a 1 mmol/l e 1,5 μ mol/L, respectivamente. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três repetições similares e independentes. *significa diferença significativa $p < 0,05$ em relação às células controle (sem adição de inibidores) e #significa diferença significativa $p < 0,05$ entre as células expressando ou não o gene *aoxPb*, mas sem adição de drogas.

5- Discussão

5- DISCUSSÃO

5.1- Estudos bioenergéticos, *in situ*, em leveduras de *P. brasiliensis*

Muito pouco é conhecido em relação à bioenergética e fosforilação oxidativa em *P. brasiliensis*. A maioria das informações a respeito da bioenergética mitocondrial deste microrganismo é baseada em estudos realizados em fungos dimórficos como *H. capsulatum* (MARESCA et al., 1979) e na transição de micélio para levedura em *Blastomyces dermatitidis* e no próprio *P. brasiliensis* (MEDOFF et al., 1987). Estes últimos autores analisaram o consumo de oxigênio por células e mitocôndrias isoladas de *P. brasiliensis* e dosaram a concentração celular de ATP ao longo da conversão de fase de micélio para levedura. Durante esta conversão, foi observada uma fase de 4 a 6 dias de dormência com ausência ou baixa taxa de respiração celular, inibição da síntese de ATP, RNA e proteína. Entretanto, estes resultados são conflitantes, uma vez que, durante a conversão de micélio para levedura ocorrem várias alterações morfológicas e diferentes perfis transcricionais, processos nos quais é consumida uma grande quantidade de energia sob a forma de ATP. Em oposição a este estágio de dormência proposto por MEDOFF e colaboradores, outros autores analisando o perfil de transcrição em células de *P. brasiliensis* durante a conversão de micélio para levedura, em tempos entre zero e 240 horas, observaram aumento

e diminuição na síntese de RNA de diferentes genes e vias metabólicas (NUNES et al., 2005). Essas variações foram evidentes desde 5 horas de transição e ocorreram ao longo dos 10 dias analisados. Além de alterações na expressão gênica, foram evidentes também as alterações morfológicas características da transição para levedura, como regressão das hifas e aparecimento de hifas em diferenciação com estruturas "clamidósporo-like", a partir das quais se originam as formas leveduriformes, com 10 horas de transição estas estruturas já eram observadas.

Além disso, MEDOFF et al. (1987) nos ensaios com células intactas, utilizaram o peso de células secas na normalização dos resultados. Esse parâmetro sofre grande variação em função das alterações morfológicas em *P. brasiliensis* durante a conversão de forma. Com isso, a morfologia e o número de mitocôndrias na forma micelial podem não ser os mesmos na forma leveduriforme, assim como, a relação entre a massa dessas duas formas do fungo e a atividade mitocondrial. Estes autores utilizaram a ruptura das células com pérolas de vidro para o isolamento de mitocôndrias. Este procedimento tem se mostrado muito drástico para o isolamento de mitocôndrias podendo comprometer a integridade das membranas, condição essencial para a avaliação do acoplamento mitocondrial. Além disso, a lise das células de *P. brasiliensis* utilizando-se pérolas de vidro possui baixo rendimento em função da rigidez da parede celular deste fungo.

Nos trabalhos anteriores, o processo de fosforilação oxidativa pela mitocôndria, bem como a capacidade de manter o potencial de membrana em células de *P. brasiliensis* não foram demonstrados. Desta forma, o presente trabalho tem a finalidade de caracterizar melhor os processos de fosforilação oxidativa, e a participação de vias mitocondriais no desenvolvimento da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, assim como, na conversão da forma de micélio para levedura.

Assim, devido à falta de informações e os resultados conflitantes da literatura, os quais não foram capazes de demonstrar o processo de fosforilação oxidativa e a capacidade de *P. brasiliensis* manter o potencial de membrana mitocondrial, nos propusemos estender os conhecimentos a respeito da função mitocondrial deste fungo.

Para a avaliação das funções mitocondriais foram utilizados esferoplastos. A produção de esferoplastos é uma abordagem utilizada para o isolamento de mitocôndrias ou permeabilização da parede celular em organismos que apresentam parede celular rígida, como em diferentes espécies de fungos, *Candida parapsilosis* (MILANI, SCHEREIBER & VERCESI, 2001), *Podospora anserina* (KOLL et al., 2001), *A. fumigatus* (TUDELLA et al., 2003) *A. nidulans* (LEITER et al., 2005) e *S. cerevisiae* (SLANINOVA et al., 2003). Esse método consiste na digestão de polissacarídeos da parede celular com enzimas líticas e confere melhor rendimento e eficiência no isolamento ou avaliação mitocondrial em células fúngicas.

A parede celular em fungos é formada por uma camada rígida constituída de polissacarídeos localizada externamente à membrana plasmática. Esta composição geralmente é específica para cada espécie ou linhagem de fungo, conferindo a estes suas características morfológicas. As paredes celulares fúngicas normalmente possuem α -glucanas, β -glucanas, peptidomananas e fibrilas de quitina, a qual exerce importante papel durante a formação de brotamentos (MARESCA & KOBAYASHI, 1989).

A parede celular de *P. brasiliensis*, assim como de outros fungos patogênicos, tem sido extensivamente estudada em relação a sua morfogênese, biosíntese e composição. Ela é constituída basicamente de polissacarídeos, principalmente β -1,3-glucanas e α -1,3-glucanas. Sendo as β -1,3-glucanas encontradas na fase de micélio e em pequenas quantidades na fase de levedura, enquanto as α -1,3-glucanas são predominantemente encontradas na fase leveduriforme. Em ambas as fases são encontrados polímeros de quitina, constituídos de cadeias não ramificadas com resíduos de *N*-acetilglucosamina ligados por ligações do tipo β -1,4 (KANETSUNA et al., 1972).

A produção de esferoplastos de *P. brasiliensis* foi realizada utilizando-se as enzimas Glucanex®, Liticase e Chitinase, em diferentes concentrações, isoladas ou em combinações. A combinação de Glucanex® com Chitinase apresentou a melhor e mais rápida formação de esferoplastos.

Entretanto, estes esferoplastos mostraram-se mais frágeis e instáveis às manipulações, com uma curta viabilidade para os experimentos de consumo de oxigênio e potencial de membrana mitocondrial. A utilização de Glucanex® isolada demonstrou uma formação de esferoplastos mais lenta, porém, estas células apresentaram uma viabilidade de várias horas a 4°C, além de permeabilidade às principais drogas e compostos adicionados durante os experimentos para avaliação mitocondrial.

Pôde-se observar pelas medidas de consumo de oxigênio e de potencial de membrana mitocondrial que a adição à suspensão celular de diferentes substratos exógenos como NADH, succinato, substratos do complexo I e substratos do complexo I em conjunto com NAD^+ , induziram o aumento do consumo de oxigênio e potencial de membrana, indicando que a membrana plasmática dos esferoplastos apresentava-se permeável aos substratos respiratórios. As respostas observadas após as adições de substratos, inibidores e desacopladores da fosforilação oxidativa nas medidas de consumo de oxigênio e potencial de membrana foram semelhantes.

O acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação de ADP foi demonstrado em ensaios de consumo de oxigênio e de medida do potencial de membrana mitocondrial. Nestes experimentos, a adição de ADP levou a um aumento do consumo de oxigênio e diminuição do potencial de membrana, sendo que esses efeitos foram revertidos pela adição de oligomicina, agente inibidor da ATP-sintase. Estes dados

sugerem que o ADP adicionado estaria sendo utilizado na síntese de ATP pela ATP-sintase. O ADP promove uma diminuição no potencial de membrana, uma vez que o gradiente de prótons é utilizado pela ATP-sintase na fosforilação do ADP, além disso, durante esse processo ocorre o aumento de consumo de oxigênio devido ao maior fluxo de elétrons através da cadeia respiratória. Outra evidencia de acoplamento entre a oxidação de substratos, o consumo de oxigênio e a formação de potencial de membrana na forma leveduriforme de *P. brasiliensis* foi o aumento do consumo de oxigênio e dissipação do potencial de membrana pela adição de FCCP. Essa droga é um ionóforo de prótons que pode atravessar a membrana mitocondrial interna transportando prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Com isso, ocorre a dissipação do gradiente de prótons, formado pelo bombeamento destes prótons durante a oxidação dos substratos e transporte de elétrons, causando a inibição do potencial de membrana e aumento no consumo de oxigênio. O aumento no consumo de oxigênio, na presença de drogas desacopladoras, ocorre devido ao maior fluxo de elétrons na cadeia respiratória, com a finalidade de restabelecer o gradiente de prótons e o potencial de membrana mitocondrial.

A atividade, em leveduras de *P. brasiliensis*, dos quatro complexos transportadores de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial foi demonstrada utilizando-se substratos e inibidores específicos dos diferentes complexos.

O complexo I foi evidenciado pela oxidação de substratos clássicos desse complexo, o qual foi inibido por rotenona, um inibidor específico do complexo I. Succinato foi capaz de estimular a respiração e a fosforilação do ADP em leveduras de *P. brasiliensis*, indicando a presença do complexo II, cuja atividade foi inibida por malonato. A inibição parcial da respiração por antimicina A e KCN indica, respectivamente, a presença da ubiquinol citocromo *c* oxidoreductase (complexo III) e citocromo *c* oxidase (complexo IV).

O consumo de oxigênio inibido por antimicina A foi revertido pela adição de uma mistura TMPD/ascorbato, essa mistura pode transferir elétrons diretamente a citocromo *c* gerando um consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Entretanto, a mistura TMPD/ascorbato não foi sensível à adição de ADP e também não gerou potencial de membrana mitocondrial, possivelmente por sua oxidação contribuir pouco com o translocamento de prótons (apenas 2 prótons por par de elétrons transportados pelo complexo IV).

Mitocôndrias de fungos podem apresentar alguns componentes e vias alternativas, não presentes em mitocôndrias de células animais. Nossos resultados mostram a presença de duas enzimas mitocondriais alternativas, uma oxidase alternativa e uma NADH desidrogenase alternativa externa. A atividade da oxidase alternativa foi demonstrada pelo consumo de oxigênio resistente a inibição por antimicina A ou cianeto, como anteriormente demonstrado para outros fungos como

C. albicans (SHEPHERD, et al., 1978), *A. fumigatus* (TUDELLA et al., 2003), *H. capsulatum* (MARESCA et al., 1979) e *A. niger* (ZEHENTGRUBER et al., 1980), entre outros. Essa resistência ocorre devido à atividade da enzima oxidase alternativa que transfere elétrons diretamente da ubiquinona para o oxigênio, gerando uma via de consumo de oxigênio paralela e resistente a inibidores do complexo III e IV. Nucleotídeos purínicos estimulam a atividade da oxidase alternativa em fungos, essa hipótese foi confirmada ao observarmos que AMP ou GMP causaram um aumento no consumo de oxigênio pela respiração resistente a cianeto. As drogas BHAM e SHAM são inibidores específicos da enzima oxidase alternativa e a utilização delas inibiu totalmente a respiração resistente a cianeto, reforçando as evidências da presença de uma oxidase alternativa ativa na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Essa enzima parece ser importante para o metabolismo da forma leveduriforme durante a sua fase de crescimento exponencial, uma vez que, a quantificação de sua expressão durante essa fase de crescimento revelou um aumento gradual na expressão do gene *aoxPb*, atingindo o pico de expressão com 96 horas de crescimento, enquanto, durante a fase estacionária a sua expressão diminuiu acentuadamente. Esse perfil de expressão do gene *aoxPb* foi observado também em *C. albicans* por HUH & KANG (2001).

A atividade da NADH desidrogenase alternativa externa, em leveduras de *P. brasiliensis*, foi demonstrada pela oxidação de

NADH exógeno com aumento de consumo de oxigênio e formação de potencial de membrana mitocondrial, ambos resistentes à inibição por rotenona e sensíveis a inibição por flavona. Em mamíferos, o NADH exógeno não é oxidado diretamente e também não é capaz de atravessar a membrana interna da mitocôndria. Nestas células, os elétrons do NADH citosólico entram na cadeia respiratória de forma indireta, ou seja, são transferidos a moléculas intermediárias pela ação de transaminases, que posteriormente entram no ciclo dos ácidos tricarboxílicos na matriz mitocondrial gerando NADH. O NADH gerado na matriz mitocondrial pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos é oxidado principalmente pelo complexo I, cuja atividade pode ser inibida por rotenona. Entretanto, em outros organismos como plantas e fungos estão presentes enzimas alternativas que oxidam o NADH citosólico e transferem os elétrons dessa oxidação diretamente a ubiquinona. Estas NADH desidrogenases alternativas são resistentes à inibição por rotenona, mas são inibidas por flavona.

Interessantemente, os esferoplastos da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* foram capazes de gerar potencial de membrana e aumentar o consumo de oxigênio a partir da adição de NAD^+ . A adição de NAD^+ também estimulou o consumo de oxigênio e potencial de membrana gerado por uma mistura de substratos do complexo I. Para verificar se havia presença de NADH nas soluções de NAD^+ foi realizada uma

varredura do espectro de absorção dessas soluções e não foi detectada a presença de NADH.

O consumo de oxigênio e potencial de membrana gerados por NAD⁺ foram parcialmente inibidos por rotenona 40 µmol/L, concentrações maiores não alteraram o efeito inibitório. Por outro lado, flavona 0,5 mmol/L inibiu parcialmente o consumo de oxigênio e o potencial de membrana, mas uma concentração 2 vezes maior inibiu totalmente esses parâmetros. O consumo de oxigênio e potencial de membrana estimulados por NAD⁺ não ocorreu pela via da succinato desidrogenase (complexo II), uma vez que malonato, um inibidor específico desta via, não interferiu nestes efeitos.

O efeito de NAD⁺ nos processos de fosforilação oxidativa foram descritos por SCHWITZGUÉBEL & PALMER (1982) em mitocôndrias isoladas de *N. crassa*. Neste trabalho foi observado o aumento da oxidação de substratos de sítio I, principalmente malato, na presença de NAD⁺ exógeno. Recentemente, BRADSHAW & PFEIFFER (2006) também relatam a influencia de NAD⁺ sobre a oxidação de substratos de sítio I e principalmente de etanol em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* e foi sugerido a presença de um possível mecanismo de entrada de NAD⁺ exógeno para a matriz mitocondrial. Nesse sentido, TODISCO et al. (2005) descreveram e caracterizaram um possível transportador mitocondrial de NAD⁺ em *S. cerevisiae*. Entretanto, este mecanismo de transporte de NAD⁺ em células fúngicas ainda não está totalmente elucidado e

por isso são necessários novos trabalhos que corroborem essa proposta antes de afirmar-se que o efeito de NAD^+ exógeno sobre a fosforilação oxidativa, em nossos experimentos, se processe pela entrada do mesmo na mitocôndria.

Além disso, em células permeabilizadas, organelas e moléculas grandes como proteínas não são perdidas, mas pequenos solutos e co-fatores podem ser perdidos através da membrana plasmática. As células esferoplastizadas tornam-se um pouco túrgidas, aumentando o volume celular e isso também poderia diluir os solutos e cofatores citoplasmáticos. Dessa forma, a adição de NAD^+ exógeno poderia restabelecer as concentrações ótimas ou ativar enzimas citoplasmáticas, ligadas principalmente à via glicolítica, ao ciclo do glioxilato e à fermentação etanólica. Estas enzimas utilizariam NAD^+ como acceptor de elétrons gerando NADH e este poderia ser oxidado por NADH desidrogenases externas e paralelamente também seriam formados substratos do complexo I e intermediários do ciclo de Krebs.

Neste contexto, trabalhos publicados nos últimos três anos reforçam a hipótese da participação de vias citoplasmáticas na geração de NADH e outros substratos dos processos de fosforilação oxidativa na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. Os estudos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* realizados por MARQUES et al. (2004), FELIPE et al. (2005) e NUNES et al. (2005) relatam o aumento da expressão de genes ligados à fermentação alcoólica, à

degradação de ácidos graxos livres, aminoácidos, assim como, de enzimas ligadas ao ciclo do glioxilato. A ativação do ciclo do glioxilato é acompanhada pela ativação de enzimas citoplasmáticas ligadas à fermentação etanólica e gliconeogênese (SAMOKHVALOV et al., 2004). Além da geração direta de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, como succinato, oxaloacetato, malato e piruvato, pela ativação do ciclo do glioxilato (LORENZ & FINK, 2002), o aumento de NAD^+ poderia, ainda, ativar ou acelerar a conversão de aminoácidos em substratos oxidáveis pela ação de aminotransferases (TAKADA & NOGUCHI, 1985). Outra possibilidade seria a ativação de mecanismos carreadores de substratos na membrana mitocondrial, uma vez que são descritos carreadores sensíveis ao aumento da concentração de NAD^+ (KUNJI & ROBINSON, 2006; ROBINSON & KUNJI 2006). A geração citoplasmática de NADH paralelamente a geração de substratos do complexo I após a adição de NAD^+ poderia explicar a sensibilidade parcial a inibição por rotenona e menor sensibilidade à inibição por flavona (0,5 mmol/l) quando se utilizou NAD^+ , comparado à utilização de NADH.

A inibição da NADH desidrogenase alternativa por flavona (1 mmol/L) e posterior adição de NAD^+ e uma mistura de substratos do complexo I gerou um potencial de membrana similar ao gerado por succinato ou NADH. Estes dados sugerem que na forma leveduriforme de *P. brasiliensis* o complexo I e a NADH desidrogenase alternativa externa funcionam

concomitantemente, oxidando NADH. Entretanto, a atividade da NADH desidrogenase alternativa é preponderante em relação à atividade do complexo I, com a oxidação de NADH ocorrendo preferencialmente pela via alternativa. Essa idéia é reforçada pelo fato do potencial de membrana gerado a partir de NAD^+ e substratos do complexo I, quando as duas vias estão ativas, ser menor do que o potencial gerado quando a NADH desidrogenase alternativa esta inibida. Este efeito pode ser explicado pelo fato do fluxo de elétrons desviados do complexo I através da NADH desidrogenase alternativa contribuir menos para o translocamento de prótons e geração do potencial de membrana, uma vez que, diferentemente do complexo I, a oxidação de NADH pela via alternativa não está acoplada ao bombeamento de prótons. Diferenças estruturais entre a NADH desidrogenase alternativa e o complexo I, também podem resultar em diferenças na velocidade da oxidação e consumo de NADH. Uma diferença estrutural importante entre o complexo I e a NADH desidrogenase alternativa esta no grupo prostético flavina, acceptor de elétrons, presente nestas duas enzimas. No complexo I o grupo flavina é uma flavina mononucleotídeo (FMN), enquanto na NADH desidrogenase é uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (KERSHER, 2000). Outro fato que contribui para a velocidade de oxidação do NADH é a transferência dos elétrons para a ubiquinona, que ocorre de forma direta pela NADH alternativa, enquanto, no complexo I a transferência de elétrons do NADH passa por uma série de

grupos prostéticos além do FMN, antes de serem transferidos a ubiquinona (KERSHER, 2000; VIDEIRA & DUARTE, 2002; VINOGRADOV, 2001).

Essa hipótese discutida anteriormente corrobora o trabalho de BUNOUST et al. (2005), os quais descrevem um novo mecanismo regulatório para a entrada de elétrons, via NADH, na cadeia respiratória. Neste mecanismo, a competição dos elétrons para entrarem na cadeia respiratória gera vias preferenciais e ao mesmo tempo inibe outras vias, sendo que as NADH desidrogenases externas são favorecidas sobre outras NADH desidrogenases. Entretanto, a oxidação de succinato não é afetada por esse mecanismo e pode ocorrer simultaneamente a oxidação de NADH por qualquer NADH desidrogenase.

Em nossos resultados foi observado que a inibição do complexo I e/ou da NADH desidrogenase alternativa não afetaram a oxidação de succinato. Succinato é o substrato energético mais eficiente e sua oxidação preferencial exerce papel crucial no fornecimento de energia para funções fisiológicas da célula (SAMOKHVALOV et al, 2004). Essas considerações foram reforçadas investigando o aumento da formação e oxidação de succinato em células de *S. cerevisiae* ativas comparadas a células quiescentes (AKHMEROV, 1986), onde o succinato foi o principal substrato oxidável utilizado pelas células durante estas duas condições.

Aparentemente, succinato exerce uma função energética importante nas células leveduriformes de *P. brasiliensis* em

condições adaptativas e de estresse (BAILÃO et al., 2006). Os autores observaram que em células leveduriformes de *P. brasiliensis* incubadas com sangue humano, ocorre um aumento de expressão de genes relacionados a transporte celular como transportadores de aminoácidos acídicos, de glicose, de íons cálcio e do carreador mitocondrial fumarato/succinato *antiporter*. O aumento de expressão deste carreador evidencia o papel importante da oxidação de succinato na fase leveduriforme deste microrganismo.

Na fase leveduriforme do fungo *P. brasiliensis* utiliza-se, preferencialmente, succinato e NADH exógeno, uma vez que, esses dois substratos ao longo de toda a curva de crescimento deste fungo demonstraram maiores taxas de consumo de oxigênio e geração de potencial de membrana.

Por outro lado, o consumo de oxigênio e geração de potencial de membrana a partir da oxidação de substratos do complexo I foram menores e variáveis ao longo da curva de crescimento da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. A influência de NAD^+ sobre estes parâmetros e o efeito dos inibidores rotenona e flavona também variou em diferentes tempos de crescimento do fungo. Alguns autores haviam descrito essa variação entre a atividade do complexo I e das NADH desidrogenases alternativas durante a curva de crescimento do fungo filamentoso *N. crassa* (SCHWITZGUÉBEL & PALMER, 1982). Neste trabalho, os autores descreveram duas vias para a oxidação de substratos ligados a NAD(H) durante a curva de

crescimento do fungo, sendo que neste organismo também houve variação na atividade destas vias ao longo das fases exponencial e estacionária. Dentre estas duas vias uma é resultante da atividade do complexo I (sensível à inibição por rotenona) cuja atividade aumenta significativamente no final da fase de crescimento exponencial permanecendo aumentada ao longo da fase estacionária, e a segunda via a NADH desidrogenase alternativa externa (resistente à inibição por rotenona) cuja atividade é maior no início e ao longo da fase de crescimento exponencial.

Em nossos resultados pôde-se observar uma menor inibição do consumo de oxigênio e potencial de membrana por rotenona e, ao mesmo tempo, aumento da inibição por flavona, durante a fase exponencial de crescimento (a partir das 48 horas). Indicando, na fase exponencial, uma participação maior da NADH desidrogenase alternativa do que do complexo I no processo de fosforilação oxidativa. Além disso, ao longo dessa mesma fase de crescimento, foi detectado uma diminuição no número de cópias do gene *nd6Pb* (subunidade 6 do complexo I) e ao mesmo tempo um aumento no número de cópias do gene *ndhPb* (NADH desidrogenase alternativa). Foi possível observar também no início da fase exponencial, cuja inibição por rotenona foi maior, uma maior expressão do gene *nd6Pb* em relação ao gene *ndhPb*.

Apesar dessas variações nos níveis de expressão desses dois genes durante a curva de crescimento do fungo, em nenhum

dos tempos analisados foi detectado um número de cópias muito baixo que indicasse a não expressão gênica de algum deles. No entanto, durante a fase de crescimento exponencial é evidente a tendência oposta na expressão dos genes, com o aumento de *ndhPb* e diminuição de *nd6Pb*. Enquanto, na fase estacionária o nível de expressão dos genes é praticamente o mesmo e atinge o pico de expressão para os dois genes. A maior expressão dos genes *nd6Pb* e *ndhPb* na fase estacionária, em termos energéticos, é de certa forma contrastante. Uma vez que, nessa fase de crescimento, na maioria dos organismos as células não se dividem mantendo apenas um metabolismo anaplerótico. Entretanto, ALMEIDA et al. (2006) demonstraram que o ciclo celular em *P. brasiliensis* ocorre de forma diferente do convencional. Segundo estes autores, durante a fase estacionária em *P. brasiliensis*, *C. neoformans* e algumas arqueobactérias a replicação completa do genoma continua acontecendo, mesmo sem a célula se dividir, ocorrendo o acúmulo de material genético. Os autores destacam ainda que nesta fase, ocorrem alterações morfológicas na célula de *P. brasiliensis* como o surgimento de estruturas "Pseudohifalike".

Desta forma, todas estas oscilações observadas nos processos de fosforilação oxidativa no fungo *P. brasiliensis*, em diferentes fases de crescimento do fungo e em relação a diferentes substratos energéticos utilizados, podem ser

decorrentes da integração entre o metabolismo energético mitocondrial e citoplasmático.

Nesta integração entre processos citoplasmáticos (ciclo do glioxilato, fermentação etanólica e transaminases citosólicas) e matriciais (algumas etapas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos), seriam gerados acetil-CoA e NADH no citoplasma, esse acetil-CoA poderia gerar succinato e malato a partir de oxaloacetato e glioxilato e finalmente NADH citosólico e succinato seriam oxidados de maneira acoplada a fosforilação de ADP (SAMOKHVALOV et al., 2004). Essa integração seria importante para a adaptação e resistência de células fúngicas. Assim, em organismos que realizem fermentação etanólica, como o *P. brasiliensis*, a transferência de elétrons via cadeia respiratória mitocondrial teria como principal papel manter o equilíbrio do potencial redutor celular através da oxidação de equivalentes redutores citoplasmáticos como o NADH e succinato gerado no ciclo do glioxilato. Outro papel seria a manutenção de reações anapleróticas e o balanço do metabolismo lipídico e protéico. Nesses organismos, o processo de transferência de elétrons via cadeia respiratória poderia ocorrer também de maneira totalmente desacoplada sem a função de produção de ATP. Isto é possível quando a transferência de elétrons ocorre através de duas enzimas alternativas, a NADH desidrogenase alternativa e a oxidase alternativa. Elétrons que entrem na cadeia respiratória via NADH desidrogenases alternativas, assim como,

os elétrons transferidos via complexo II pela oxidação de succinato, excluem o translocamento de prótons via complexo I. Caso esses elétrons sejam totalmente transferidos via ubiquinona para oxidases alternativas e desta para átomos de oxigênio os outros dois sítios de translocamento de prótons da cadeia respiratória, complexos III e IV, também serão excluídos resultando em potencial de membrana zero e nenhuma geração de ATP (JOSEPH-HORNE et al., 2001).

Em resumo, nossos resultados em relação aos processos bioenergéticos, na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, apontam para uma integração entre vias clássicas e alternativas, tanto mitocondriais quanto citoplasmáticas. O papel principal dessa integração seria conferir ao fungo uma flexibilidade na utilização de diferentes fontes de energia e uma maior adaptabilidade a variações de seu microambiente.

Na figura 35 esta ilustrada a integração entre as principais vias estudadas neste trabalho e relacionadas aos processos de fosforilação oxidativa em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Figura 35- Representação da hipótese para a integração entre componentes clássicos e alternativos da cadeia respiratória mitocondrial com vias metabólicas citosólicas, nos processos de fosforilação oxidativa em leveduras de *P. brasiliensis*. MME- membrana mitocondrial externa; MMI- membrana mitocondrial interna; UQ- Ubiquinona; I, II, III, IV e V- Complexos da cadeia respiratória mitocondrial; Cit *c*- Citocromo *c*; Ndh ext- NADH desidrogenases alternativas externa; AOX- Oxidase alternativa.

5.2- Efeito de inibidores da cadeia respiratória sobre a conversão de forma em *P. brasiliensis*

A infecção por *P. brasiliensis* e o estabelecimento da paracoccidioidomicose está intimamente ligado à conversão da forma de micélio para levedura durante a interação do fungo com o hospedeiro. Durante este processo de conversão de forma em *P. brasiliensis* ocorre uma série de alterações em processos metabólicos, muitos deles ligados a mitocôndria (FELIPE et al., 2005).

Em culturas de *C. albicans* RUY et al., (2006) observaram uma inibição do crescimento deste fungo quando cultivado na presença de antimicina A, KCN e BHAM, mas rotenona não inibiu o crescimento de *C. albicans*. Os autores argumentam que aparentemente, vias respiratórias específicas em *C. albicans* podem ser determinantes para o desenvolvimento celular.

Em nosso trabalho foi observado que, a inibição do complexo IV por KCN retardou o início da transição de forma por 48 horas, enquanto, a inibição do complexo I por rotenona não causou nenhum atraso nessa transição (dados não mostrados). Por outro lado, a inibição da enzima oxidase alternativa, por SHAM ou do complexo III por antimicina A, foram capazes de retardar o início da transição de forma por até 120 horas. E quando utilizadas as combinações KCN/SHAM e antimicina/SHAM ocorreu a inibição total da mudança de micélio para levedura. Aparentemente, a via respiratória através do

complexo I e IV contribua menos para o processo de conversão de forma em *P. brasiliensis*, uma vez que, a inibição das mesmas não afetou a transição de micélio para levedura. Por outro lado, a via oxidase alternativa e o complexo III devem exercer um papel importante na conversão de forma em *P. brasiliensis*, pois quando inibidas afetaram o processo de conversão de forma.

A influência da oxidase alternativa em processos de transição e adaptabilidade celular foi observada em outros organismos patogênicos e tem sido sugerida como um possível alvo para terapia. A inibição da oxidase alternativa diminuiu o crescimento *in vitro* de *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* e *P. falciparum* (ROBERTS et al., 2004). O mesmo efeito inibitório foi observado em culturas de *T. brucei brucei* (NIHEI et al, 2003). Em cepas de *C. albicans* resistentes a antifúngicos azólicos foi observado que a associação de propil-galato, outro inibidor de oxidases alternativas, diminuiu a resistência de *C. albicans* a estes antifúngicos (D'AURIA et al. 2001).

Além da oxidase alternativa, a inibição do complexo III também é descrita como possível alvo terapêutico. Em *P. falciparum* o uso da droga atovaquona, cujo mecanismo de ação consiste na inibição do complexo III, demonstrou um efeito significativo na inibição do desenvolvimento ou mudança de fase do parasita, e este efeito foi potencializado pela associação com inibidores da oxidase alternativa (MURPHY &

LANG-UNNASCH, 1999). Em *C. albicans* foi demonstrado que a atividade antifúngica do peptídeo salivar humano histatina 5 ocorre de modo semelhante a ação da antimicina, ou seja, pela inibição do complexo III mitocondrial (HELMERHORST et al., 2001).

Entretanto, ainda não está claro se esses efeitos antifúngicos e antiparasitários, de inibidores da cadeia respiratória, ocorram por deficiência de energia (ATP), pela subsequente formação de EROs e danos celulares, ou por ambos.

5.3- Efeito de inibidores da cadeia respiratória e indutores de estresse oxidativo sobre geração de EROs e expressão do gene *aoxPb* em leveduras de *P. brasiliensis*

Em nosso trabalho foi demonstrada a relação entre o transporte de elétrons pela cadeia respiratória, a geração de EROs e o nível de expressão de oxidase alternativa. Foi observado que as células leveduriformes de *P. brasiliensis* mesmo sem tratamento com drogas que induzem geração de EROs, produzem uma taxa basal dessas espécies reativas ao longo do tempo. Uma fonte significativa de EROs é a ubiquinona (coenzima Q), cujo estado de semiquinona formado durante seu ciclo redox pode doar elétrons diretamente a molécula de O₂ gerando radicais superóxidos (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A inibição do complexo III da cadeia respiratória com antimicina A é uma forma de se elevar o nível de ubiquinona

reduzida e conseqüentemente favorecer o escape de elétrons e aumento na formação de EROs. Esse efeito da antimicina A foi observado em nosso trabalho utilizando-se células de *P. brasiliensis*.

Outra fonte importante de radicais livres é o complexo I. Este complexo enzimático é o principal sítio de geração de EROs em mitocôndrias isoladas de células de mamíferos (KUDIN et al., 2004; KUDIN et al., 2005). A participação do complexo I na geração de EROs tem sido descrita também em fungos por GALKIN & BRANDT (2005), os quais demonstraram que o complexo I isolado de *Yarrowia lipolytica* na presença de ubiquinona e NADH, e inibição por rotenona, produz EROs de forma dependente da concentração deste inibidor.

Quando as células de *P. brasiliensis* foram tratadas com rotenona houve um aumento significativo na geração de EROs ao longo do tempo de incubação, no entanto, este aumento foi menor do que o provocado por antimicina A. Esse resultado com rotenona demonstra que mesmo aumentando o nível de EROs na célula esta droga não interferiu na conversão de forma do fungo, como discutido anteriormente.

Diferentemente do observado com antimicina A, o tratamento das células de *P. brasiliensis* com KCN não causou aumento significativo na geração de EROs. Provavelmente a atividade da enzima oxidase alternativa, a qual gera uma via alternativa para a oxidação da ubiquinona reduzida, preveniu o escape de elétrons pelo excesso de ubiquinona reduzida e

consequente geração de EROs. No entanto, esse efeito preventivo da oxidase alternativa não foi observado ao se utilizar antimicina A, provavelmente a inibição do complexo III leve a uma maior formação de ubiquinona reduzida do que a inibição do complexo IV. Essa diferença na geração de EROs provocada por antimicina A e KCN também foi observada em mitocôndrias isoladas de *C. albicans* (RUY et al, 2006). Neste trabalho, os autores sugeriram que a atividade de uma citocromo c paralela, na presença de baixas concentrações de KCN, poderia contribuir para a diminuição da ubiquinona reduzida, prevenindo a geração de EROs. No entanto, em nossos experimentos, não avaliamos a influência da concentração de KCN na geração de EROs, em todos os ensaios foi utilizado KCN 1 mmol/L, concentração suficiente para inibir totalmente o consumo de oxigênio quando associado a SHAM 2 mmol/L.

Além disso, não foi possível inibir a oxidase alternativa e observar a sua participação na defesa ou na geração de EROs, pois os inibidores SHAM, BHAM e propil-galato interagiram com a sonda utilizada na detecção das espécies reativas.

Uma abordagem para tentar verificar a participação e importância da oxidase alternativa em condições de estresse oxidativo foi tratar as células com drogas indutoras de estresse oxidativo e quantificar o nível de expressão do gene *aoxPb*. O tratamento com H₂O₂, menadiona, menadiona+NPS, rotenona, rotenona+KCN e antimicina A aumentaram o nível de expressão do gene *aoxPb* de maneira significativa.

Interessantemente, KCN não causou aumento significativo na expressão de *aoxPb*, enquanto, outros trabalhos relatam um aumento induzido por KCN em *C. albicans* (HUH & KANG, 2001) e *H. capsulatum* (JOHNSON et al, 2003). NPS um agente doador de óxido nítrico não aumentou a expressão do gene, mas NPS+menadiona aumentou em quase 3 vezes o nível de expressão do gene *aoxPb*. Menadiona gera principalmente radicais superóxido, que na presença de óxido nítrico resultam na formação de peroxinitrito, um dos radicais mais deletérios para a célula. A formação de peroxinitrito e posterior dano celular pode ser a justificativa para a maior indução da expressão de *aoxPb* quando foi utilizada a mistura rotenona/NPS.

Aparentemente, a regulação da oxidase alternativa em *P. brasiliensis* está relacionada com o estado oxidativo celular, pois os inibidores da cadeia respiratória que aumentaram a produção de EROs como antimicina A e rotenona, também aumentaram a expressão do gene *aoxPb*, enquanto, inibidores que não aumentaram EROs, como KCN, não induziram o aumento da expressão de *aoxPb*. A inibição da oxidase alternativa por SHAM não aumentou a sua expressão, sugerindo que a atividade desta enzima não exerce controle sobre a sua própria expressão.

5.4- Estudos moleculares envolvendo a atividade da oxidase alternativa e seu gene *aoxPb*

Apesar de vários trabalhos terem abordado o papel da atividade oxidase alternativa em diversos organismos diferentes, principalmente plantas e fungos, a função exata desta enzima ainda não foi totalmente esclarecida.

A atividade oxidase alternativa, assim como a presença de um gene que codifica esta enzima, já foi descrito em *P. brasiliensis*. Entretanto, a análise da seqüência gênica e de aminoácidos da oxidase alternativa, ainda não havia sido realizada ou apresentada.

Em nosso trabalho as análises das seqüências de nucleotídeos revelaram a presença de um intron, cujas extremidades estavam flanqueadas por seqüências consenso do tipo GT/AG, descritas por BALANCE, (1986) como necessárias para o processamento e edição do RNA mensageiro (*splicing* de RNA). Ainda, foram identificados 29 códons raros dentre os 353 que codificam os aminoácidos da proteína AOX Pb . Esses códons foram descritos por MCNULTY et al. (2003), que também demonstraram diferenças na utilização de códons entre *E. coli* e outros organismos. Essa diferença ocorre porque em *E. coli* alguns RNAs transportadores são menos expressos restringindo as possibilidades de combinação entre códons e anti-códons, comprometendo o transporte de alguns aminoácidos durante a síntese de proteínas heterólogas.

Nas análises da sequência peptídica, a AOX**Pb** apresentou um perfil muito similar a outras oxidases alternativas de fungos, possuindo as principais regiões conservadas e descritas como sítios de ligação a ferro e a ubiquinona. O perfil de hidropaticidade da AOX**Pb** também apresentou características bastante conservadas como as 2 regiões hidrofóbicas, descritas como regiões essenciais para a inserção da proteína na membrana mitocondrial. As comparações da sequência de aminoácidos da AOX**Pb** com outras AOXs fúngicas evidenciaram também uma maior similaridade com a enzima de *H. capsulatum*, uma vez que estes dois fungos são dimórficos e têm uma proximidade evolutiva e genética maior entre eles do que entre fungos filamentosos e outros organismos. A análise da proteína AOX**Pb** revelou ainda um peptídeo sinal de 27 aminoácidos na região amino-terminal, este peptídeo tem o papel de direcionar proteínas de membrana para seu local de ação e está presente em muitas proteínas mitocondriais sintetizadas no citosol (BOGSCH et al., 1998; DANESE & SILHAVY, 1998; FEKKES & DRIESSEN, 1999).

Com estas análises do gene e da proteína AOX**Pb** foi possível planejar ensaios para a expressão heteróloga do gene *aoxPb*, em sistema procariótico (*E. coli*) e eucariótico (*S. cerevisiae*).

Em *E. coli* o transporte de elétrons ocorre na membrana plasmática da célula, com a participação da ubiquinona e enzimas oxidoredutases, e o processo de síntese de ATP é

promovido pela diferença de potencial entre o citosol e o meio extracelular (UNDEN & BONGAERTS, 1997).

A expressão heteróloga do gene *aoxPb* em *E. coli* foi realizada utilizando-se a cepa *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS e 2 construções plasmidiais PET28*aoxPb* e PET28*aoxPbCT*. Essa cepa foi escolhida em função dos códons raros identificados no gene *aoxPb*. Pois é sabido que estes códons podem causar erros e até mesmo a parada da tradução do gene heterólogo, resultando em baixa ou nenhuma expressão do gene de interesse. Entretanto, utilizando-se a cepa *E. coli* Rosetta™DE3pLysS estes problemas podem ser diminuídos, pois ela possui os genes dos tRNAs correspondentes aos códons raros não reconhecidos por *E. coli* tradicionais.

Nos experimentos de expressão heteróloga em *E. coli* foi observado, por SDS-PAGE, a intensa expressão das proteínas heterólogas AOX*Pb* de 40 kDa e AOX*PbCT* de 42 kDa. Essa expressão foi confirmada pela imunodeteção com anticorpos anti-cauda de hitidinas, que marcou uma banda em torno de 42 kDa na amostra induzida de *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/PET28*aoxPbCT*. No entanto, essas bactérias não apresentaram respiração resistente a cianeto, demonstrando que o gene *aoxPb* foi expresso mas a enzima AOX*PbCT* estava inativa. A imunodeteção de uma proteína com 42 kDa, indica que a proteína AOX*PbCT* não teve o peptídeo sinal removido. Este fato pode ter contribuído, juntamente com a presença de uma cauda

C-terminal de histidinas, para a inatividade da enzima AOX Pb CT.

Por outro lado, a expressão utilizando-se *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS/PET28aox Pb apresentou respiração resistente a cianeto e sensibilidade a SHAM. A expressão da enzima AOX Pb foi responsável por 34% do consumo de oxigênio total, evidenciado pela inibição por SHAM ou BHAM e com a inibição da via da citocromo *c* esta contribuição chegou a 40% do consumo de oxigênio inicial. A proteína AOX Pb não foi marcada pelos anticorpos anti-cauda de histidinas, uma vez que essa construção não expressa a proteína com cauda de histidinas. Entretanto, a banda observada por SDS-PAGE evidencia que a proteína AOX Pb , assim como AOX Pb CT, não teve o peptídeo sinal removido. Este resultado demonstra que a presença do peptídeo sinal na região amino-terminal da proteína AOX Pb não afetou sua atividade. SIEDOW et al., (1995) propuseram a participação da parte carboxi-terminal da AOX na formação de sua estrutura terciária, com resíduos específicos de histidinas contribuindo na estabilização dos átomos de ferro que integram o sítio ativo da enzima. Com isso, a interferência na atividade da enzima AOX Pb CT pode ser consequência apenas da cauda de histidinas na região carboxi-terminal e não do peptídeo sinal na região amino-terminal. Alguns trabalhos já relataram a interferência da cauda de histidinas na atividade de outras enzimas, como na expressão em *E. coli* de um transportador

ADP/ATP de *S. cerevisiae* (FIORE et al., 2000) e da β -lactamase *Bacillus licheniformis* (LEDENT et al., 1997).

A purificação da enzima AOX_{Pb}CT para testar sua atividade *in vitro* com ou sem a cauda de histidinas poderia elucidar se realmente esses aminoácidos estariam afetando a atividade da enzima. No entanto, tentativas de se purificar a proteína AOX_{Pb}CT por cromatografia utilizando-se resinas de níquel não foram bem sucedidas. Seu caráter hidrofóbico e expressão em corpos de inclusão dificultaram a solubilização em tampões de purificação prejudicando este método.

Vários grupos de pesquisadores tentaram purificar a AOX em diferentes espécies como mencionado por AFFOURTIT et al. (2002). Estes autores discutem também sobre o pouco conhecimento em relação à estrutura e mecanismo de ação de AOXs, apesar de vários anos de estudos e tentativas de se obter a enzima pura e estável para estudos de cinética e resolução estrutural.

Além da expressão heteróloga em organismo procariótico foram realizados também experimentos de expressão heteróloga do gene *aoxPb* em sistema eucariótico. O organismo utilizado foi *S. cerevisiae*, uma vez que este fungo não apresenta respiração resistente a cianeto (MINAGAWA & YOSHIMOTO, 1987; VEIGA, 2000; JOHNSON et al., 2003), como em *E. coli* também foram utilizadas 2 construções plasmidiais diferentes, pYES_{aoxPb} e pYES_{aoxPb}NCT.

A expressão em *S. cerevisiae* não foi visualizada por SDS-PAGE, mas foi imunodetectada com anticorpos anti-cauda de histidinas. Foi observada a marcação de duas bandas, uma em torno de 48 kDa, peso estimado para AOXPbNCT, e outra de 42 kDa, peso estimado para AOXPbNCT sem o peptídeo sinal. Estas marcações demonstram que a proteína AOXPbNCT foi expressa e o peptídeo sinal foi removido. A observação de duas bandas simultaneamente, pode ser explicado pelas células utilizadas estarem na metade da fase de crescimento exponencial e sob indução da expressão do gene *aoxPb*, nessas condições a síntese protéica é máxima. Dessa forma foram detectadas proteínas, cujo peptídeo sinal já havia sido clivado e proteínas que ainda não haviam sido clivadas.

Como observado em *E. coli*, a expressão da proteína AOXPb sem a cauda de histidinas na extremidade carboxi-terminal, conferiu respiração resistente a cianeto e sensível a SHAM em células de *S. cerevisiae*. Esses dados reforçam a hipótese de que esta seqüência de histidinas extras, na posição C-terminal da AOXPb, poderia afetar a atividade da enzima, sem afetar a sua expressão. Diferentemente do observado em *E. coli*, as proteínas expressas em *S. cerevisiae* tiveram o peptídeo sinal removido.

Da mesma forma que em *E. coli* a expressão da AOXPb foi responsável por 34% do consumo de oxigênio total, evidenciado pela inibição por SHAM ou BHAM e com a inibição da via da

citocromo *c* esta contribuição atingiu 57% do consumo de oxigênio inicial.

Essa respiração resistente a cianeto originada pela atividade da oxidase alternativa pode diminuir a síntese de ATP por desviar uma parte dos elétrons da via da citocromo oxidase diminuindo assim o translocamento de prótons e o potencial de membrana mitocondrial. MATHY et al. (2006) observaram que a expressão heteróloga da oxidase alternativa de *Hansenula anomala* em *S. cerevisiae* causou uma diminuição do seu crescimento em meio líquido. Em nosso trabalho foram observados resultados semelhantes em células de *S. cerevisiae* expressando o gene *aoxPb*, tanto em meio fermentativo, quanto não fermentativo.

Outro efeito atribuído à atividade da oxidase alternativa além de diminuir o fluxo de elétrons e potencial de membrana é a manutenção da ubiquinona oxidada, prevenindo o aumento de ubiquinona reduzida e conseqüente produção de EROs. Esse efeito sobre a geração de EROs foi observado em nosso trabalho em células de *S. cerevisiae* que expressavam a *AOXPb*, quando comparado a células controle que foram transformadas apenas com o plasmídeo de expressão sem o gene *aoxPb*. No entanto, a expressão de *AOXPb* não apresentou efeito protetor significativo contra o aumento na geração de EROs provocado pela adição de antimicina A. A presença de antimicina A

aumentou significativamente a geração de EROs, tanto nas células controle quanto nas células que expressavam AOX*Pb*.

6- Conclusões

6- CONCLUSÕES

1. A utilização de glucanex® na produção de esferoplastos da forma leveduriforme da cepa 18 de *P brasiliensis* foi eficaz e possibilitou a avaliação das atividades mitocondriais *in situ*;
2. A forma leveduriforme de *P brasiliensis* possui os 5 complexos clássicos da cadeia respiratória, complexo I-V;
3. Presença de duas enzimas alternativas da cadeia respiratória mitocondrial: uma oxidase alternativa resistente a cianeto e sensível a SHAM; e uma NADH desidrogenase alternativa externa (NDH) insensível a rotenona e sensível a flavona;
4. Ocorrem variações na expressão gênica e atividade do complexo I e da NDH ao longo da curva de crescimento em leveduras de *P brasiliensis*;
5. A inibição da oxidase alternativa ou do complexo III retardou a conversão de forma em *P brasiliensis*;
6. A inibição do complexo I ou III aumentou a geração de EROs e expressão do gene *aoxPb* na forma leveduriforme de *P brasiliensis*;
7. A sequência de aminoácidos da enzima AOX_{Pb} apresentou grande similaridade com outras AOXs fúngicas, principalmente com AOX do fungo dimórfico *H. capsulatum*;

8. Na expressão de AOX Pb em *S cerevisiae* ocorre a remoção do peptídeo sinal desta proteína;
9. A inserção de uma cauda de histidinas na região carboxi-terminal causou a perda de atividade da AOX Pb expressa em *E. coli* e *S. cerevisiae*;
10. A expressão do gene *aoxPb* em *E. coli* e *S cerevisiae* confere a estes microrganismos respiração resistente a cianeto e sensível a SHAM;
11. A expressão de AOX Pb em *S cerevisiae* diminuiu a multiplicação celular e a geração de EROs.

7- Bibliografia

7- BIBLIOGRAFIA

AFFOURTIT C, ALBURY MS, CRICHTON PG, MOORE AL. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.510(3), p.121-6, 2002.

AKERMAN KE, WIKSTROM MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.68(2), p.191-7, 1976.

ALBURY, M.S.; AFFOURTIT, C.; CRICHTON, P.G.; MOORE, A.L. Structure of the Plant Alternative Oxidase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.227, p.1190-1194, 2002.

ALMEIDA AJ, MARTINS M, CARMONA JA, CANO LE, RESTREPO A, LEAO C, RODRIGUES F. New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.43(6), p.401-9, 2006.

AMORA, Y.; CHEVIONB, M.; LEVINEA, A. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. **FEBS Lett.**, v.477, p.175, 2000.

ANDERSSON, M.E.; NORDLUND, P. A revised model of the active site of the alternative oxidase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.449, p.17-22, 1999.

ANGULO-ORTEGA, A. & POLLAK, L. Paracoccidioidomycosis In: The pathological anatomy of the mycoses. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. Baker, RD (ed), Springer-Verlag, Berlin, p.507-560, 1971.

BAILAO AM, SCHRANK A, BORGES CL, DUTRA V, WALQUIRIA INES MOLINARI-MADLUM EE, SOARES FELIPE MS, SOARES MENDES-GIANNINI MJ, MARTINS WS, PEREIRA M, MARIA DE ALMEIDA SOARES C. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect.**, Paris, v.8(12-13), p.2686-97, 2006.

BANDEIRAS, T.M.; SALGUEIRO, C.A.; HUBER, H.; GOMES, C.M.; TEIXEIRA, M. The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1557, p.13-19, 2003.

BECK-SAGUE, C.M.; JARWIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980 - 1990. National Nosocomial Surveillance System. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.167, p.1247-1251, 1993.

BENARD, G.; DUARTE, A.J.S. Paracoccidioidomycosis: A model for evaluation of the effects of Human Immunodeficiency Virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.31, p.1032-1039, 2000.

BENDTSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.*, New York, v.340(4), p.783-95, 2004.

BERTHOLD, D. A.; STENMARK, P.; NORDLUND, P. Screening for functional expression and overexpression of a family of diiron-containing interfacial membrane proteins using the univector recombination system. **Protein Science**, N.Y., v.12, p.124-134, 2003.

BERTHOLD, D.A.; ANDERSSON, M.E.; NORDLUND, P. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1460, p.241-245, 2000.

BETHLEM, N.M.; LEMLE, A.; BETHLEM, E.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Semin. Resp. Med.**, São Paulo, v.12, p.81-97, 1991.

BJÖRKLÖF, K.; ZICKERMANN, V.; FINEL, M. Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. **FEBS Lett.**, v.467, p.105-110, 2000.

BOGSCH EG, SARGENT F, STANLEY NR, BERKS BC, ROBINSON C, PALMER T. An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.273(29), p.18003-6, 1998.

BONNER, W.D.; VOSS, D.O. Some characteristics of mitochondria extracted from higher plants. **Nature**, v.191, p.682-684, 1961.
BOVERIS A, CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.**, London, v.134(3), p.707-16, 1973.

BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E.; SLATER, E.C. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.46, p.955-1026, 1977.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.70, p.2837-2839, 1973.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, N.Y., p.249-254, 1976.

BRADSHAW PC, PFEIFFER DR. Loss of NAD(H) from swollen yeast mitochondria. **BMC Biochem.**, London, v.24, p.7-13, 2006.

BRAIDOT E, PETRUSSA E, VIANELLO A, MACRI F. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.451(3), p.347-50, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.6, p.89-117, 1993.

CALEGARIO, F.F.; COSSO, R.G.; FAGIAN, M.M.; ALMEIDA, F.V.; JARDIM, W.F.; JEZEK, P.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E. Simulation of potato tuber respiration by cold stress es associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. **J. Bioenerg. Biomembranes**, v.35, p.211-220, 2003.

CALICH VL, PURCHIO A, PAULA CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Kluwer Academic., Feb v.66(3), p.175-7, 1979.

CARBONELL, L.M.; KANETSUNA, F. Nature of the intrinsic factors which reduced tetrazolium salt in the histochemical demonstration of dehydrogenases in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ann. Histochim.**, Paris, v.11, p.375-384, 1966.

CAVALHEIRO RA, FORTES F, BORECKY J, FAUSTINONI VC, SCHREIBER AZ, VERCESI AE. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. **Braz J Med Biol Res.**, Sao Paulo, v.37(10), p.1455-61, 2004.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, N.Y., v.17, p.65-134, 1956.

CLARKSON, A.B. Jr.; GRADY, R.W.; GROSSMAN, S.A.; MCCALLUM, R.J.; BROHN, F.H. *Trypanosoma brucei brucei*: a systematic screening for alternatives to the salicylhydroxamic acid-glycerol combination. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.3, n.5, p.271-291, 1981.

DANESE PN, SILHAVY TJ. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. **Annu Rev Genet.**, Palo Alto Ca, v.32, p.59-94, 1998.

D'AURIA FD, LAINO L, STRIPPOLI V, TECCA M, SALVATORE G, BATTINELLI L, MAZZANTI G. In vitro activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. **J Chemother.**, Firenze, v.13(4), p.377-83. 2001.

DE VRIES S, MARRES CA. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.895(3), p.205-39, 1987.

DE VRIES, S.; MARRES, C.A.M. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.895, p.205-239, 1987.

DE VRIES, S.; VAN WITZENBURG, R.; GRIVELL, L.A.; MARRES, C.A.M. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v.203, p.587-592, 1992.

DE VRIES, S.; GRIVELL, L.A. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. biochem.**, v.176, p.377-384, 1988.

DUFOUR, E.; BOULAY, J.; RINCHEVAL, V.; SAINSARD-CHANET, A. A causal link between respiration and senescence in *Podospira anserina*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.97, p.4138-4143, 2000.

ENGELHARDT, V.A. Die beziehungen zwischen atmung und pyrophosphatumsatz in vogelerythrocyten. **Biochem. Z.**, Berlin, v.251, p.343-368, 1930.

ESCHEMANN, A.; GAIKIN, A.; OETTMEIER, W.; BRANDT, U.; KERSCHER, S. HDQ (1-Hidroxy-2-dodecil-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.3138-3142, 2004.

FAVA-NETO, G. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. **Rev. Inst. A. Lutz**, São Paulo, v.21, p.99-194, 1961.

FEKKES P, DRIESSEN AJ. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. **Microbiol Mol Biol Rev.**, Washington, DC, v.63(1), p.161-73, 1999.

FELIPE MS, ANDRADE RV, ARRAES FB, NICOLA AM, MARANHÃO AQ, TORRES FA, SILVA-PEREIRA I, POCAS-FONSECA MJ, CAMPOS EG, MORAES LM, ANDRADE PA, TAVARES AH, SILVA SS, KYAW CM, SOUZA DP, PEREIRA M, JESUINO RS, ANDRADE EV, PARENTE JA, OLIVEIRA GS, BARBOSA MS, MARTINS NF, FACHIN AL, CARDOSO RS, PASSOS GA, ALMEIDA NF, WALTER ME, SOARES CM, CARVALHO MJ, BRIGIDO MM; PBGENOME NETWORK. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.280(26), p.24706-14, 2005.

FELIPE MS, ANDRADE RV, PETROFEZA SS, MARANHÃO AQ, TORRES FA, ALBUQUERQUE P, ARRAES FB, ARRUDA M, AZEVEDO MO, BAPTISTA AJ, BATAUS LA, BORGES CL, CAMPOS EG, CRUZ MR, DAHER BS, DANTAS A, FERREIRA MA, GHIL GV, JESUINO RS, KYAW CM, LEITAO L, MARTINS CR, MORAES LM, NEVES EO, NICOLA AM, ALVES ES, PARENTE JA, PEREIRA M, POCAS-FONSECA MJ, RESENDE R, RIBEIRO BM, SALDANHA RR, SANTOS SC, SILVA-PEREIRA I, SILVA MA, SILVEIRA E, SIMOES IC, SOARES RB, SOUZA DP, DE-SOUZA MT, ANDRADE EV, XAVIER MA, VEIGA HP, VENANCIO EJ, CARVALHO MJ, OLIVEIRA AG, INOUE MK, ALMEIDA NF, WALTER ME, SOARES CM, BRIGIDO MM. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, Chichester, v.20(3), p.263-71, 2003.

FELIPE MS, TORRES FA, MARANHÃO AQ, SILVA-PEREIRA I, POCAS-FONSECA MJ, CAMPOS EG, MORAES LM, ARRAES FB, CARVALHO MJ, ANDRADE RV, NICOLA AM, TEIXEIRA MM, JESUINO RS, PEREIRA M, SOARES CM, BRIGIDO MM. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, Amsterdam, v.45(3), p.369-81, 2005.

FIORE C, TREZEGUET V, ROUX P, LE SAUX A, NOEL F, SCHWIMMER C, ARLOT D, DIANOUX AC, LAUQUIN GJ, BRANDOLIN G. Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region. **Protein Expr Purif.**, Orlando, v.19(1), p.57-65, 2000.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v.25, p.5-18, 1987.

GALKIN A, BRANDT U. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.280(34), p.30129-35, 2005.

GIETZ RD, SCHIESTL RH, WILLEMS AR, WOODS RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. **Yeast.**, Chichester, v.11(4), p.355-60, 1995.

GLAB N, WISE RP, PRING DR, JACQ C, SLONIMSKI P. Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. **Mol Gen Genet.**, Berlin, v.223(1), p.24-32, 1990.

GOLDANI, L.Z.; COELHO, I.C.; MACHADO, A.A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis and AIDS. **Scand. J. Inf. Dis.**, Stockholm, v.23, p.393, 1991.

GOLDANI, L.Z.; MARTINEZ, R.; LANDELL, G.A.; MACHADO, A.A.; COUTINHO, V. Paracoccidioidomycosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Mycopathologia**, Hagen, v.105, p.71-74, 1989.

GOLDMAN, G.H.; dos REIS MARQUES, E.; DUARTE RIBEIRO, D.C.; de SOUZA BERNARDES, L.A.; QUIAPIN, A.C.; VITORELLI, P.M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C.P.; de OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W.L.; FERREIRA, L.E.; MOREIRA, J.C.; BOGOSSIAN, A.P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; GOLDMAN, M.H. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell.**, Washington, v.2, p.34-48, 2003.

GOMES, C.M.; BANDEIRAS, T.M.; TEIXEIRA, M. J. A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. **Bioenerg. Biomembr.**, v.33, p.1-8, 2001.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, N.Y., v.166, p.557-80, 1983.

HARMAN, D. A theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, St. louis, v.11, p.298-300, 1956.

HARMAN, D. Aging and oxidative stress. **J. Int. Fed. Clin. Chem.**, Shelton, v.10, p.24-27, 1998.

HARMAN, D. The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.78, p.7124-7128, 1981.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.54, p.1015-1069, 1985.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.8, p.462-478, 1995.

HELMERHORST EJ, TROXLER RF, OPPENHEIM FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.98(25), p.14637-42, 2001.

HUH WK, KANG SO. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **Biochem J.**, London, v.1, p.595-604, 2001.

JANUÁRIO, A.; PIETRO, R.C.L.R.; RODRIGUES, E.L.L.; SILVA, C.L. Paracoccidioidomycose. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano II (nº8), p.10-11, 1999.

JARMUSZKIEWICZ W, ALMEIDA AM, VERCESI AE, SLUSE FE, SLUSE-GOFFART CM. Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.275(18), p.13315-20, 2000.

JARMUSZKIEWICZ W, MILANI G, FORTES F, SCHREIBER AZ, SLUSE FE, VERCESI AE. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.467, p.145-9, 2000.

JEZEK P, COSTA AD, VERCESI AE. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.271(51), p.32743-8, 1996.

JOHNSON, C.H.; PRIGGE, J.T.; WARREN, A.D.; McWEN, J.E. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. **Yeast**, N.Y., v.20, p.381-388, 2003.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components. **Biochim. Biophys. Act.** v. 1504, p. 179-195, 2001.

KANETSUNA F, CARBONELL LM, AZUMA I, YAMAMURA Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol.**, Washington, v.110(1), p.208-18, 1972.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M. Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of

Paracoccidioides brasiliensis. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.92, p.1315-1320, 1966.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHN, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, Hagen, v.99, p.119-128, 1987.

KEILIN, D. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animal, yeast, and higher plants. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, London, v.898, p.312-339, 1925.

KERSHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1459, p.274-283, 2000.

KIRIMURA, K.; YODA, M.; SHIMIZU, H.; SUGANO, S.; MIZUNO, M.; KINO, K.; USAMI, S. Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalised by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.64, p.2034-2039, 2000.

KOLL F, SIDOTI C, RINCHEVAL V, LECELLIER G. Mitochondrial membrane potential and ageing in *Podospora anserina*. **Mech Ageing Dev.**, Limerick Ireland, v.122(2), p.205-17, 2001.

KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, Tarrytown, NY, v.26, p.463-71, 1999.

KREBS, H.A. The history of the tricarboxilic acid cycle. **Perspect. Biol. Med.**, Chicago, v.14, p.154-170, 1972.

KUDIN AP, BIMPONG-BUTA NY, VIELHABER S, ELGER CE, KUNZ WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.279(6), p.4127-35, 2004.

KUDIN AP, DEBSKA-VIELHABER G, KUNZ WS. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. **Biomed Pharmacother.**, Paris, v.59(4), p.163-8, 2005.

KUNJI ER, ROBINSON AJ. The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.1757(9-10), p.1237-48, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, E.C. Paracoccidioidemícoses. In: **Micologia médica**. Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, p.248-261, 1991.

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

LEDENT P, DUEZ C, VANHOVE M, LEJEUNE A, FONZE E, CHARLIER P, RHAZI-FILALI F, THAMM I, GUILLAUME G, SAMYN B, DEVREESE B, VAN BEEUMEN J, LAMOTTE-BRASSEUR J, FRERE JM. Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.413(2), p.194-6, 1997.

LEHNINGER, A.L. Oxidative phosphorylation. **Harvey Lect.**, N.Y., v.49, p.176-215, 1955.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: **Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers, Inc., p.542-597, 1993.

LEITER E, SZAPPANOS H, OBERPARLEITER C, KAISERER L, CSERNOCH L, PUSZTAHELYI T, EMRI T, POCSI I, SALVENMOSER W, MARX F Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v.49(6), p.2445-53, 2005.

LENDERBERG, E.M. & COHEN, S.N. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.119, n.3, p.1072-1074, 1974.

LORENZ, M.C.; FINK, G.R. Life and death in a macrophage: Role of glyoxylate cycle in virulence. **Eukariot. Cell.**, v. 1, n. 5, p. 657-662, 2002.

LUTTIK, M.A.H.; OVERKAMO, K.M.; KOTTER, P.; DE VRIES, S.; VAN DJKEN, J.K.; PRONK, J. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encodes separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.24529-24534, 1998.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v.22, p.121-124, 141-144, 1908.

MAIA IG, BENEDETTI CE, LEITE A, TURCINELLI SR, VERCESI AE, ARRUDA P. AtPUMP: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.;429(3), p.403-6, 1998.

- MARESCA B, KOBAYASHI GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. **Microbiol Rev.**, Washington, v.53(2), p.186-209, 1989.
- MARESCA, B., et al. Role of cytochrome in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 7, p. 4596-4600, 1981.
- MARESCA, B.; LAMBOWITZ, A.M.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Respiration in the yeast and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.138(2), p.647-9, 1979.
- MARRES, C.A.; DE VRIES, S.; GRIVELL, L.A. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v.195, p.857-862, 1991.
- MATHY G, NAVET R, GERKENS P, LEPRINCE P, DE PAUW E, SLUSE-GOFFART CM, SLUSE FE, DOUETTE P. *Saccharomyces cerevisiae* mitoproteome plasticity in response to recombinant alternative ubiquinol oxidase. **J Proteome Res.**, Washington, DC, v.5(2), p.339-48, 2006.
- MATSUSHITA, K.; OTOFUJI, A.; IWAHASHI, M.; TOYAMA, H.; ADACHI, O.; MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, p.8271-8276, 1999.
- MCEWEN, J.G.; BRUMMER, E.; STEVEBS, D.A.; RESTREPO, A. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v.25, p.343-345, 1987.
- MCNULTY DE, CLAFFEE BA, HUDDLESTON MJ, PORTER ML, CAVNAR KM, KANE JF. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.**, Orlando, v.27(2), p.365-74, 2003.
- MCNULTY, D. E.; CLAFFEE, B. A.; HUDDLESTON, M. J.; KANE, J. F. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGC in *Escherichia coli*. **Protein. Expr. Purif.**, San Diego, v.27, p.365-374, 2003.
- MEDOFF, G. et al. Mycelial-to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomycetes dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.** V. 169, n. 9, p. 4055-4060, 1987.
- MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in aroids. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, Palo Alto, v.26, p.117-126, 1975.
-

MELO, A.M.; DUARTE, M.; MÖLLERS, I.M.; PROKISCH, H.; DOLAN, P.L.; PINTO, L.; NELSON, M.A.; VIDEIRA, A. The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. **Biol. Chem.**, v.276, p.3947-3951, 2001.

MEZEI, L.M. & STORTS, D.R. Purification of PCR products In: PCR technology: current innovation. Griffin, H.G. & Griffin, A. M. (eds.), **CRC-Press**, Flórida, 1994.

MILANI G, SCHEREIBER AZ, VERCESI AE. Ca(2+) transport into an intracellular acidic compartment of *Candida parapsilosis*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.29, p.80-4. 2001.

MILLAR AH, DAY DA. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.398(2), p.155-8, 1996.

MINAGAWA N, YOSHIMOTO A. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **J Biochem** (Tokyo), v.101(5), p.1141-6, 1987.

MINAGAWA, N.; YABU, Y.; KITA, K.; NAGAI, K.; OHTA, N.; MEGURO, K.; SAKAJO, S.; YOSHIMOTO, A. An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, V.84, P.271-280, 1997.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, London, v.191, p.144-148, 1961.

MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1059, p.121-140, 1991.

MOORE, A.L.; UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. **J. Bioenerg.**, London, v.27, p.367-377, 1995.

MORELAND, D.E. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Hodgson, E.; Levi, P.E. In: **Introduction to Biochemical Toxicological**, Norwalk, C.T., Appleton & Lange, p.345-366, 1994.

MORRISON, D.A. Transformation in *Escherichia coli* preservation of competent cells. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.132, p.349-351, 1977.

MURPHY AD, LANG-UNNASCH N. Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium*

falciparum. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v.43(3), p.651-4, 1999.

NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.204, p.271-276, 2001.

NIHEI, C.; FUKAI, Y.; KAWAI, K.; OSANAI, A.; YABU, Y.; SUZUKI, T.; OHTA, N.; MINAGAWA, N.; NAGAI, K.; KITA, K. Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.538, p.35-40, 2003.

NIHEI, C.; FUKAI, Y.; KITA, K. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1587, p.234-239, 2002.

NIÑO-VEGA, G.A.; CALCAGNO, A.M.; SAN-BLAS, F.; GOODAY, G.W.; GOW, N.A.R. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, Oxford, v.38, p.437-441, 2000.

NOGUEIRA V, RIGOLET M, PIQUET MA, DEVIN A, FONTAINE E, LEVERVE XM. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.276(49), p.46104-10, 2001.

NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; LEITE, D.B.; DA SILVA, VS, DOS REIS MARQUES E, DA SILVA FERREIRA ME, RIBEIRO DC, DE SOUZA BERNARDES LA, GOLDMAN MH, PUCCIA R, TRAVASSOS LR, BATISTA WL, NOBREGA MP, NOBREGA FG, YANG DY, DE BRAGANCA PEREIRA CA, GOLDMAN GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell.**, Washington, v.4 (12), p.2115-28, 2005.

NUNES, L.R.; et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukariot. Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, 2005.

OETTMEIR, W.; MASSON, KK.; SOLL, M.; REIL, E. Acridones and quinolones as inhibitors of ubiquinone functions in the mitochondrial respiratory chain. **Biochem. Soc. Trans.**, v.22, p.213-216, 1994.

ORSI A, BELTRAN B, CLEMENTI E, HALLEN K, FEELISCH M, MONCADA S. Continuous exposure to high concentrations of nitric oxide leads to persistent inhibition of oxygen consumption by J774 cells as well as extraction of oxygen by the extracellular medium. **Biochem J.**, London, UK, v.346, p.407-12, 2000.

OSIEWACZ, H.D. Mitochondrial functions and aging. **Gene**, Amsterdam, v.286, p.65-71, 2002.

PANIAGO AM, DE FREITAS AC, AGUIAR ES, AGUIAR JI, DA CUNHA RV, CASTRO AR, WANKE B. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **J Infect.**, London, v.51(3), p.248-52, 2005.

PEDRO, R.; DE, J.; AOKI, F.H.; BOCATO, R.S.B.S; BRANCHINI, M.L.M.; GONCALES-JUNIOR, F.L.; PAPAORDANOU, P.M.O; RAMOS, M.C. Paracoccidioidomicose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v.31, p.119-125, 1989.

PETRUSSA E, BRAIDOT E, NAGY G, VIANELLO A, MACRI F. Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.307(3), p.267-71, 1992.
R.N. AKHMEROV, Qualitative difference in mitochondria of endothermic and ectothermic animals. **FEBS Lett**, Amsterdam, V.198 pp.251-255, 1986.

RASKIN, I.; EHMAMN, A.; MELANDER, W.R.; MEEUSE, B.J.D. Salicylic acid: A natural inducer of heat production in *Arum lilies*. **Science**, Washington, v.237, p.1601-1602, 1987.

RASMUSSEN, A.G.; SVENSSON, A.S.; KNOOP, V., GROHMANN, L.; BRENNICKE, A. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. **Plant J.**, v.20, p.79-87, 1999.

REES, J.R.; PINNER, R.W.; HAJJEH, R.A.; BRANDT, M.E.; REINGOLD, A.L. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: Results of population-based laboratory active surveillance. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.27, p.1138-1147, 1998.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. A puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CATAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, Oxford, v.39, p.233-241, 2001.

ROBERTS CW, ROBERTS F, HENRIQUEZ FL, AKIYOSHI D, SAMUEL BU, RICHARDS TA, MILHOUS W, KYLE D, MCINTOSH L, HILL GC, CHAUDHURI M, TZIPORI S, MCLEOD R. Evidence for mitochondrial-derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential anti-microbial agent target. **Int J Parasitol.**, Oxford, v.34(3), p.297-308, 2004.

ROBINSON AJ, KUNJI ER. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.21, p.2617-22, 2006.

ROLDÁN, J.C.; TABARES, A.M.; GÓMEZ, B.L.; ARISTIZÁBAL, B.E.; COCK, A.M.; RESTREPO, A. The oral route in the pathogenesis of paracoccidioidomycosis: An experimental study in BALB/c mice infected with *P. brasiliensis* conidia. **Mycopathologia**, Hague, v.151, p.57-62, 2000.

RUY F, VERCESI AE, KOWALTOWSKI AJ. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. **J Bioenerg Biomembr.**, New York, v.38(2), p.129-35, 2006.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1090, p.102-108, 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: **A laboratory manual**. Ed 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

SAMOKHVALOV, V. et al. Inhibition of krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Sacharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. **Biochime.** v. 86, p. 39-46, 2004.

SAN-BLAS F, SAN-BLAS G, GIL F. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol.**, Oxford, v.32(5), p.381-8, 1994.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abingdon, v.31, p.99-113, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467; 1977.

SCANDALIOS JG. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiol.**, Lancaster, v.101(1), p.7-12, 1993.

SCHWITZGUEBEL JP, PALMER JM. Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*. **J Bacteriol.**, Washington, v.149(2), p.612-9, 1982.

SEMIGHINI CP, DE CAMARGO ZP, PUCCIA R, GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, NY, v.44(4), p.383-6, 2002.

SHEPHERD MG, CHIN CM, SULLIVAN PA. The alternate respiratory pathway of *Candida albicans*. **Arch Microbiol.**, Berlin, v.23(1), p.61-7, 1978.

SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. Plant mitochondrial electron-transfer and molecular biology. **Plant Cell.**, Rockville, v.7, p.821-831, 1995.

SIEDOW, J.N.; UMBACH, A.L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1495, p.432-439, 2000.

SILVEIRA, J.F.; NOGUEIRA, M.I.; CISALPINO P.S.; GALINDO, I.; RAMÍREZ, J.L.; MORTARA, A. . Eletrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, p.742-47, 1998.

SKULACHEV VP. BIOENERGETIC, Aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**. 2006 Apr;11(4):473-85. Boston

SLANINOVA I, HOLUBAROVA A, SVOBODA A. Immunodetection of spectrin-like proteins in yeasts. **Can J Microbiol.**, Ottawa, v.49(3), p.189-96, 2003.

SMALL, W.C.; MCALISTER-HENN, J. Identification of cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v.180, p.4051-4055, 1998.

SPLENDORE, A. Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribú degli Exoascei (*Zymonema brasiliense*) In: **Volume in onore del Prof. Angelo Cellinelli 25° anno di insegnamento**. 1912.

STENMARK, P.; NORDLUND, P. A prokaryotic alternative oxidase present in the bacteria *Novosphingobium aromaticivorans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.552, p.189-192, 2003.

TAKADA Y, NOGUCHI T. Characteristics of alanine: glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine

biosynthesis from tricarboxylic acid-cycle intermediates. **Biochem J.**, London, v.1, p.157-63, 1985.

TODISCO S, AGRIMI G, CASTEGNA A, PALMIERI F. Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.20, n.281(3), p.1524-31. 2006.

TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; SORIANI, F. M.; SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A. *In situ* evidence of alternative oxidase end an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, N.Y., v.36, p.162-172, 2004.

UNDEN G, BONGAERTS J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.1320(3), p.17-34, 1997.

VAN BURIK, J.A.H.; SCHRECKISE, R.W.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A.; MYERSON, D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Med. Mycol.**, Oxford, v.36, p.299-303, 1998.

VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.38, p.703-734, 1997.

VEIGA A, ARRABACA JD, LOUREIRO-DIAS MC. Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.190(1), p.93-7, 2000.

VEIGA, A.; ARRABAÇA, J.D.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeast. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v.3, p.239-245, 2003.

VERCESI AE, KOWALTOWSKI AJ, GRIJALBA MT, MEINICKE AR, CASTILHO RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Rep.**, New York, v.17(1), p.43-52, 1997.

VIDEIRA A, DUARTE M. From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.1555(1-3), p.187-91, 2002.

VINOGRADOV AD. Respiratory complex I: structure, redox components, and possible mechanisms of energy transduction. **Biochemistry (Mosc)**., New York, v.66(10), p.1086-97, 2001.

WAGNER, A.M.; MOORE, A.L. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism. **Biosci. Rep.**, London, v.17, p.319-333, 1997.

WAINIO WW. Reactions of cytochrome oxidase. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.212(2),p.723-33, 1955.

WAINIO WW. Reduction of cytochrome oxidase with ferrocyclochrome c. **J Biol Chem**, Baltimore, .v.216(2), p.593-9, 1955.

WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Suppl.I, v.95, p.153-158, 2000.

WARBURG, O. O chemische konstitution von fermenten. **Ergeb. Enzymforsch.**, Leipzig, v.7, p.210-245, 1930.

WESTERMANN, B., PROKISC, H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. **Fungal Genet Biol.**, Orlando, v.36, p.91-97, 2002.

WOOD PM, HOLLOMON DW. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. **Pest Manag Sci.**, Sussex, UK, v.59(5), p.499-511, 2003.

YAGI, T. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. **J. Bioenerg. Biomembr**, v.23, p.211-225, 1991.

ZEHEHTGRUBER, O., KUBICEK, C. P., AND RÖHR, M. Alternative respiration of *Aspergillus niger*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.8, p.71-74, 1980.

8- Anexos

TTCACTCTATCCCTTCTTTGGAAGCTGAAAAAGATAATAATAAGCTGTTACCTACCATA
 TCACAATATCACCTGTCTTCATCAAGAATTTGGCCTGAATCAAAGCCTTTTGAGAAACG
 TAGTTTCATCCCTCTGCTCGCCATGTATCCGATCTCCGCAGGACCCATGAGAACCTTTG
 TTCTCTCCCGCTCTGCCTCGTCCATACTGCGTGGCTCATTTCGGTCAATCAACTGCTCTT
 TCCAGAGGTCTCCAGTGTAGTAGTCCTCTGCTTTACTATAACATTGCCCTTGGGAGCAA
 GAGGTGCTTCTCAGCAGGTCCCCGCCAACGAGCCAAAGAATATTTCCCAGCCCTCAGTG
 GAACAAAACATATTGTCGAGTCTGAAACAACATGGGCACATCCAATGTTACCCGAAGAG
 CAGATGAAGAGTATTGTCATCGCACATCGAAATGCTGAGACCTGGTCCGATTGGGTGTC
 CTTGGGAACCGTTTCGTATGTTGCGCTGGGCTACAGATCTGGCAACAGGTTACAAACATC
 CCGGGAAGTCGGACCAGAATGAGCAATTTGTTATGACTGAGAAGAAATGGATCATCCGG
 TTCATTTTTCTAGAAACCGTTGCTGGTGTCCCTGGAATGGTTGGAGGTATGCTCCGCCA
 TCTCCGAAGCCTAAGACGAATGAAGCGGGATAATGGATGGATCGAAACTCTTTTAGAAG
 AAGCATACAACGAGAGAATGCACCTGCTGTTCATTCTGAAACTCGCTAAACCAGGGTGG
 TTTATGCGGCTCATGGTTTTAGGAGCCCAGGGTGTCTTCTTCAACTCTTTCTTCATGGC
 ATACCTCATCTCCCCCGGACCTGCCACCGCTTCGTCGGGTACCTCGAAGAGGAGGCTG
 TTATGACGTACACACACGCAATTAACGACCTCGAAGCTGGGAAGTTGCCTGAGTGGGCC
 AACAAAGAGGCTCCAGATATTGCCGTGGCTTACTGGCACATGCCAGAAAACAAGAGAAC
 CATTCTGGACTTGCTGTACTATATCCGTGCCGATGAAGCTAAGCATTGTGAGGTCAACC
 ACACCCTGGCCAACTTGAAGCCCAACGTCGATCCAAATCCTTATACCTCGAAGTACGAT
 AACCCCGATGTGCCTCATCCAACGAAGACAGCCGAGATAATCAAACCCACTGGCTGGGA
 AAGAAAGGATGTCATCTAAAATGGACAAGGAACCCTTTCAAATGCTGAATTAACGTCAA
 CCTCTTATCAATCCTTCGACATATTTTCGCCAGGGTGGGGTTACCAAGCACTGACCCTT
 TCTTGCTTTGTGATTTTCGTTTGTGCGAGCCTTGAAGAAGACACCACTCTGATACCCCGTC
 TCCATATCCTTTCCACTCAAATTAACATACAAAAAACAGACTAAATCATAAAAATGCA
 TAATTGGCGGGGTGGTTTGGGCATAGCGGATGGCGTTGTTTTCTTTTGTCTTTGCCTT
 GTTGTCTCTCCTGTTGTGTCTTGCATAGTCAGTTAAACGGAGTTCTAATTTATTTACC
 ATCCGCATTCTTTAATTTCACTTTTTCCGTCCGTCATTTGTTTTTAAGTTTGTCTGCT
 TGTAATCCGTTTGTCTGTTTAATTGACATTTCGTGGGATGGGAAACCATTATGCGGACA
 TGTTTGTCTGTTCAAGTGACTTTTGTTTTAGAAGAGAAATGAAGTTTTGTTTCAAATGCA
 TTCCAAAGGAGTAATAATCTAATGTCCAACCAA

Met Y P I S A G P Met R T F V L S R S A S S I L R G S F G Q S T A L S R G L Q C
 S S P L L Y N I A L G S K R C F S A G P R Q R A K E Y F P A L S G T K H I V E
 S E T T W A H P Met F T E E Q Met K S I V I A H R N A E T W S D W V A L G T V
 R Met L R W A T D L A T G Y K H P G K S D Q N E Q F V Met T E K K W I I R F I
 F L E T V A G V P G Met V G G Met L R H L R S L R R Met K R D N G W I E T L L
 E E A Y N E R Met H L L S F L K L A K P G W F Met R L Met V L G A Q G V F F N
 S F F Met A Y L I S P R T C H R F V G Y L E E E A V Met T Y T H A I N D L E A G
 K L P E W A N K E A P D I A V A Y W H Met P E N K R T I L D L L Y Y I R A D E
 A K H C E V N H T L A N L K P N V D P N P Y T S K Y D N P D V P H P T K T A
 E I I K P T G W E R K D V I Stop

Anexo A: Sequência nucleotídica do clone de cDNA (contig PbCC006-F12) do gene *aoxPb* e sua sequência de aminoácidos deduzidos.

Anexo B: Mapa de restrição do sítio de clonagem do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen).

pET-28a-c(+) Vectors

TB074 12/98

	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag®/thrombin/T7•Tag® configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> HI - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*HI at 198.

Anexo C: Mapa de restrição do sítio de clonagem do plasmídeo pET-28a(+) (Novagen).

Map of pYES2

The figure below summarizes the features of the pYES2 vector. The sequence for pYES2 is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 17).

Comments for pYES2:
5856 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451
 T7 promoter/priming site: bases 475-494
 Multiple cloning site: bases 501-600
 CYC1 transcription terminator: bases 608-856
 pUC origin: bases 1038-1711
 Ampicillin resistance gene: bases 1856-2716 (C)
 URA3 gene: bases 2734-3841 (C)
 2 micron (μ) origin: bases 3845-5316
 f1 origin: bases 5384-5839 (C)
 (C) = complementary strand

Anexo D: Mapa de restrição do sítio de clonagem do plasmídeo pYES2 (Invitrogen)

pYES2/NT Vector

Map of pYES2/NT

The figure below summarizes the features of the pYES2/NT vectors. The complete sequences for pYES2/NT A, B, and C are available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page 27).

Comments for pYES2/NT A: 6038 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451
 GAL1 forward priming site: bases 414-437
 T7 promoter/priming site: bases 475-494
 ATG initiation codon: bases 510-512
 Polyhistidine (8xHis) region: bases 522-539
 Xpress™ epitope: bases 579-602
 Enterokinase (EK) recognition site: bases 588-602
 Multiple cloning site: bases 602-669
 V5 epitope: bases 682-723
 Polyhistidine (8xHis) region: bases 733-750
 CYC1 transcription termination signal: 783-1036
 CYC1 reverse priming site: bases 800-818
 pUC origin: bases 1220-1893
 Ampicillin resistance gene: bases 2038-2898 (complementary strand)
 URA3 gene: bases 2916-4023 (complementary strand)
 2μ origin: bases 4027-5498
 f1 origin: bases 5566-6021 (complementary strand)

Continued on next page

Anexo E: Mapa de restrição do sítio de clonagem do plasmídeo pYES2NCT (Invitrogen).

Anexo F: Gráfico de predição de peptídeo sinal e seu potencial sítio de clivagem de acordo com BENDTSEN, et al. (2004).