

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular e bioquímica de um transportador  
mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus  
fumigatus*.

Laís de Lourdes de Lima Bálico

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular e bioquímica de um transportador  
mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus  
fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biociências  
Aplicadas à Farmácia para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências  
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Bállico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 03/11/2014. A  
versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

*Resumo*

BÁLICO, L.L.L. **Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeos de *Aspergillus fumigatus***. 2014. 143 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico e tornou-se um dos principais agente patogênico oportunista em pacientes imunossuprimidos. Estudos prévios em nosso laboratório foi demonstrado que em mitocôndrias de *P. brasiliensis* e de *A. fumigatus*, o NAD<sup>+</sup> era capaz de induzir a formação de potencial de membrana mitocondrial, o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de NAD<sup>+</sup>/NADH, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Através de ferramentas de bioinformática, foi identificado no *Aspergillus Gene Database*, uma sequência com 32% de identidade com o gene *ndt1p* de *S. cerevisiae*. A sequência de cDNA, contendo 1.194 pb foi obtida usando *PCR-Overlapping* e clonada em vetor pGEM®-T Easy. Em seguida, a sequência foi subclonada em vetor de expressão pET28-a(+) e expressa em *E. coli* BL21(DE3). A proteína recombinante foi purificada a partir dos corpos de inclusão e sua identidade confirmada por espectrometria de massas e por *Western Blotting* usando anticorpo anti-His-tag. A proteína recombinante foi utilizada para produção de anticorpo policlonal anti-Ndt1 em coelho. Para expressão em levedura, o cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* foi subclonado em vetor pYES2 e as leveduras *S. cerevisiae*  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  foram transformadas. Foi realizada a curva de crescimento e indução da expressão da proteína recombinante Ndt1, a presença da proteína foi detectada utilizando anticorpo policlonal anti-Ndt1 após 16 horas de expressão. Nesse período foi verificado que as leveduras estavam em fase de crescimento exponencial. A cepa duplo mutante apresenta uma taxa de crescimento menor quando comparada com a cepa expressando a proteína recombinante quando crescidas em meio fermentável. As mitocôndrias isoladas de ambas as cepas foram submetidas à medida do potencial de membrana onde apresentavam acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação oxidativa. Além disso, ficou evidenciado que na cepa expressando a proteína recombinante, NAD<sup>+</sup> induziu a formação de um potencial de membrana maior que na cepa controle. O transporte de NAD<sup>+</sup> foi realizado e demonstrou que a cepa expressando a proteína Ndt1 tinha um aumento na fluorescência de NADH, mostrando que NAD<sup>+</sup> foi capaz de entrar na matriz mitocondrial e posteriormente ser reduzido a NADH por enzimas da matriz mitocondrial. A determinação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando as sondas fluorescentes CM-H<sub>2</sub>DCFDA e *MitoSox Red* em esferoplastos da levedura *S. cerevisiae*. Ambos experimentos não houve diferença significativa entre a cepa expressando a proteína Ndt1 e a cepa controle. As proteínas carboniladas foram determinadas utilizando anticorpo anti-DNP, após a reação com dinitrofenilhidrazona e não há diferença significativa entre as cepas. Finalmente, para confirmação da localização celular da proteína Ndt1, os esferoplastos de *S. cerevisiae* foram submetidos à microscopia confocal, onde ficou evidenciado a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias na cepa de *S. cerevisiae* transformada com a construção *pYES/ndt1*, o mesmo perfil não foi observado na cepa  $\Delta ndt1\Delta ndt2$ .

Palavras-chaves: *Aspergillus fumigatus*; transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo; mitocôndria; *Saccharomyces cerevisiae*.

*Abstract*

BÁLICO, L.L.L. **Molecular and biochemical characterization of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide carrier of *Aspergillus fumigatus***. 2014. 143 f. Thesis (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The *A. fumigatus* is a saprophytic fungus and is a major opportunistic pathogen in immunosuppressed patients. Previous studies in our lab has showed that mitochondrias of the *P. brasiliensis* and *A. fumigatus*,  $\text{NAD}^+$  is able to induce the formation of mitochondrial membrane potential, which could be dissipated by FCCP, suggesting the presence of a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  carrier as described in *S. cerevisiae*. Using bioinformatics tools, it was identified in *Aspergillus* Gene database a sequence containing 32% of identity with the gene *ndt1p* of *S. cerevisiae*. A fragment of cDNA was obtained from the *ndt1p* mRNA sequence, containing 1194 bp by using PCR-overlapping and cloned in *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* vector. Then, the sequence was subcloned in pET28-a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was purified from inclusion bodies and the identity confirmed by mass spectrometry and by Western Blotting using anti-His-tag antibody. The recombinant protein was used to produce polyclonal antibody anti-Ndt1 in rabbit. For expression in yeast, the *ndt1* cDNA of *A. fumigatus* was subcloned into pYES2 vector and the yeast *S. cerevisiae*  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  were transformed. Growth curve and induction of the recombinant protein expression Ndt1 was performed and the protein was detected using a polyclonal anti-Ndt1 antibody after 16 hours of expression. During this period it was found that the yeast were in exponential growth phase. The double mutant strain shows a slower growth rate compared to the strain expressing the recombinant protein growth rate when grown in fermentable medium. The isolated mitochondria from both strains were subjected to measurement of the membrane potential which showed coupling between substrate oxidation and oxidative phosphorylation. Furthermore, these measurements evidenced that the strain expressing the recombinant protein  $\text{NAD}^+$  induced the formation of a membrane potential larger than the control strain. The transport  $\text{NAD}^+$  was evaluated and showed that the strain expressing the protein Ndt1 has an increase in NADH fluorescence, indicating that  $\text{NAD}^+$  was able to enter into the mitochondrial matrix and then reduced to NADH by enzymes from the matrix. The determination of the production of reactive oxygen species was performed using the fluorescent probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA and *MitoSox Red* in spheroplasts of the yeast *S. cerevisiae*. Both experiments showed no significant difference between the strain expressing Ndt1 protein and strain control. The carbonylated proteins levels were checked using anti-DNP, after the reaction with dinitrophenylhydrazone and there is no significant difference between the strains. Finally, to confirm the cellular localization of the protein Ndt1, spheroplasts of *S. cerevisiae* were subjected to confocal microscopy, which evidenced the co-location of Ndt1 protein with mitochondria in *S. cerevisiae* strain transformed with the construction *pYES/ndt1*. This same profile was not observed in strain  $\Delta ndt1\Delta ndt2$ .

**Keywords:** *Aspergillus fumigatus*; nicotinamide adenine dinucleotide carrier; mitochondria; *Saccharomyces cerevisiae*.

## *1 - Introdução*



Nas últimas décadas devido ao avanço das terapias imunossupressoras, as infecções oportunistas por microrganismos aumentaram o risco de vida em pacientes. Os principais patógenos fúngicos humanos são as espécies de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (KWON-CHUNG & SUGUI, 2013; HOMEI & WORBOYS, 2013; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são ubíquos e saprofíticos, esse gênero compreende 250 espécies, sendo que aproximadamente 20 delas podem ser patógenos de humanos. Os fungos desse gênero possuem um papel significativo na reciclagem de carbono e nitrogênio. Esse gênero tem sido utilizado na indústria alimentícia e de produtos farmacêuticos. Entretanto, nos últimos anos passou a ter grande impacto na saúde pública devido às infecções oportunistas (DAGENAIS & KELLER, 2009).

No gênero *Aspergillus* as principais espécies oportunistas são: *Aspergillus fumigatus*; *A. flavus*; *A. nidulans* e *A. terreus*. No entanto, o maior causador de doenças em humanos é o *A. fumigatus*, responsável por 90% dos casos, tornando-o assim um dos principais patógenos oportunistas atuais (CAMARGO & HUSAIN, 2014). Aspergilose é o termo geral que designa uma doença que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

A primeira descrição de aspergilose em humanos foi realizada em 1842. Porém apenas em 1953 houve a primeira descrição de aspergilose invasiva como doença oportunista, a partir dessa data os números de casos aumentaram consideravelmente em países desenvolvidos (DENNING, 1998).

### **1.1. *Aspergillus fumigatus***

O *A. fumigatus* pode ser encontrado em todas as regiões do mundo e acredita-se que o seu nicho ecológico natural seja o solo, onde o fungo sobrevive e cresce em vegetais em decomposição. Portanto, áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002).

Devido ao seu ciclo biológico simples, essa espécie possui uma alta capacidade de esporulação, 1-100 conídios/m<sup>3</sup>. Dessa forma, diariamente milhares de conídios são inalados, sendo esta a principal forma de infecção dessa espécie. Porém, a sua capacidade de causar doença em pacientes imunocompetentes é comprometida pela capacidade do sistema imunológico inato em reconhecer e realizar o *clearance* nos pulmões (LATGÉ, 1999; KWON-CHUNG & SUGUI, 2013).

Com a elucidação da sequência genômica deste fungo por Nierman e colaboradores (2005) muitos mecanismos envolvidos com a patogenicidade e com a resistência do hospedeiro a este fungo estão sendo entendidos e poderão ser utilizados para melhorias no diagnóstico e tratamento das doenças (STEINBACH, 2013).

### **1.2. Características macro e microscópicas**

As colônias do *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona a 37°C. Nestas condições, as colônias possuem coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios.

A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas, multinucleadas, septadas com paredes paralelas, as quais se estendem por suas extremidades. As novas ramificações ficam em suas extremidades sub-apicais, onde em conjunto com a massa de crescimento formam os micélios.

As cabeças conidiais apresentam ao microscópio óptico, aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides uniseriadas, recobrando dois terços superiores de sua superfície. Os conídios, de coloração verde, possuem 2,5–3 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. Os conídios são produzidos a partir de uma estrutura diferenciada, denominada conidióforos. As hifas vegetativas iniciam-se a partir de um conídio, o qual foi produto da reprodução assexuada (DENNING, 1998; SULLIVAN; MORAN & COLEMAN, 2005).

A reprodução assexuada dos ascomicetos inicia-se quando um esporo contendo núcleo único germina formando a hifa multinucleada, o crescimento desta origina o conidióforo. No interior do conidióforo os núcleos se dividem através de mitose, permitindo a produção de conídios assexuados e haplóides. Esses conídios são liberados no meio ambiente por disrupção, podendo crescer e tornar-se micélios haplóides, continuando o ciclo (BENNETT & KLICH, 1992; YU, 2010).

O *A. fumigatus* é uma espécie termo-resistente e pode crescer em temperaturas superiores a 55°C, sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies (HAINES, 1995; DENNING, 1998).

### 1.3. Patogênese

Para que o fungo tenha sucesso na infecção do hospedeiro é necessário que o fungo seja agressivo no momento em que o sistema imunológico esteja debilitado (LATGÉ & CALDERONE, 2002). A virulência dessa espécie é multifatorial, uma vez que o fungo precisa crescer e se adaptar a condições de estresse impostas pelo hospedeiro. Atualmente, entende-se que a patogênese das doenças causadas por fungos é determinada por interações entre hospedeiro, fungo e ambiente, existindo também fatores genéticos envolvidos nessas interações (CHAUDHARY & MARR, 2011).

O principal grupo de risco para infecções causadas por *A. fumigatus* são pacientes imunocomprometidos/imunossuprimidos, entre eles destacam-se: pacientes em tratamento com terapias imunossupressoras, quimioterápicos, e com corticoesteróides; pacientes com AIDS; pacientes transplantados e com doença granulomatosa crônica e outras síndromes que afetam o sistema imunológico. No Brasil e em outros países em desenvolvimento, as doenças causadas por fungos ainda são negligenciadas e acredita-se que por isso o número real de casos relatados ainda seja subestimado (CHAKRABARTI *et al.*, 2011; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Existem diversas formas clínicas para a infecção causada por *Aspergillus*, todas relacionadas com o trato respiratório, uma vez que a inalação de conídios é a principal forma de infecção por *A. fumigatus*. Entretanto, outros locais de infecção como pele, peritônio, ossos e olhos, dentre outros, têm sido descritos em pacientes saudáveis e imunocomprometidos (PITT, 1994; DENNING, 1998).

No trato respiratório de pacientes imunocompetentes após a inalação dos conídios ou antígenos de *Aspergillus* spp. O sistema imunológico inato atua realizando a fagocitose destes, não permitindo a colonização pelo micélio. Em pacientes com resposta imunológica ausente/deficiente os conídios conseguem sobreviver, crescer e colonizar o trato respiratório. Nesses casos podem ocorrer as formas mais graves de infecção como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva que envolve o crescimento e colonização pelo micélio (BODEY & VARTIVARIAN, 1989; DENNING, 1998; HOHL & FELDMESSER, 2007; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Nas formas mais graves, após a inalação dos conídios, a aspergilose provoca lesões granulomatosas nos pulmões ou nos brônquios, que podem se disseminar do tecido pulmonar para os vasos sanguíneos que irrigam estes órgãos, afetando o encéfalo, trato gastrointestinal e os rins, sendo a forma disseminada geralmente aguda e fatal (ABAD *et al.*, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2011; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

A evolução da doença em pacientes acometidos é muito rápida, pode-se visualizar a presença de infiltrados inflamatórios de 8 a 24 horas após a infecção de coelhos com conídios, entre 8 a 16 horas as hifas começam a surgir e a partir de 24 horas há o aumento das hifas e inflamação (HOPE *et al.*, 2010).

O tratamento dessas infecções é restrito a um limitado número de drogas, sendo dois grupos mais utilizados os azóis e a anfotericina B (LATGÉ & CALDERONE, 2002). O agente de primeira linha para o tratamento é o voriconazol, sendo sua eficácia maior que a da anfotericina B, no início do

tratamento e apresenta também uma menor incidência de efeitos adversos. Drogas como caspofungina e micafungina, estão na classe das equinocandinas, sendo consideradas terapias de recuperação, suas utilizações no tratamento primário das infecções ainda é pouco esclarecido. Atualmente, as terapias disponíveis causam inúmeras reações adversas para o paciente, entre entre elas a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade (HERBRECHT *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 2008; DENNING, 2003; DENNING & HOPE, 2010; KARTSONIS; NIELSEN & DOUGLAS, 2003; NAGASAKI *et al.*, 2009).

A evolução da infecção pelo *A. fumigatus* para aspergilose invasiva necessita de processos de germinação dos conídios, o qual é essencial para o ciclo celular e crucial para o estabelecimento da infecção. A germinação dos conídios está diretamente relacionada com a atividade mitocondrial, a qual se encontra ativa desde os estágios iniciais deste processo para a produção de energia em forma de ATP (TAUBITZ *et al.*, 2007).

#### **1.4. Função mitocondrial**

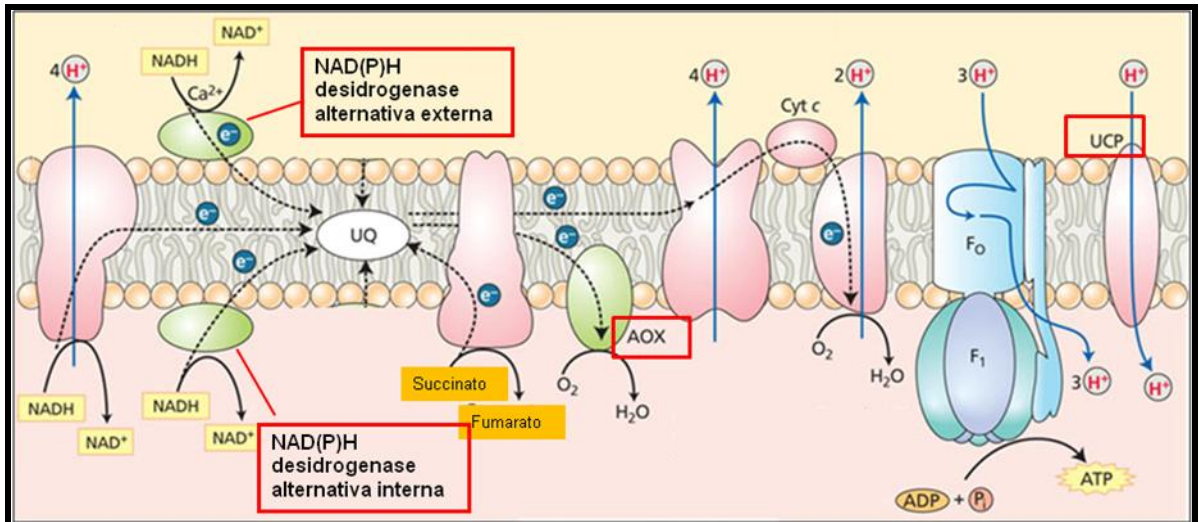
Mitocôndrias são organelas celulares localizadas no citoplasma das células de eucariotos, envolvidas em diversos processos celulares como: vias de sinalização, metabolismo, interação com outras organelas celulares, e principalmente são responsáveis pela síntese de ATP, energia química responsável pela manutenção estrutural e funcional das células (HATEFI, 1985; RUNKEL; BAUMEISTER & SCHULZE, 2014).

A fosforilação oxidativa acoplada ao transporte de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, juntamente com o bombeamento de prótons

através da membrana mitocondrial interna produz energia, na forma de ATP. A fosforilação oxidativa é um sistema formado por quatro supercomplexos proteicos: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase ligada ao FAD), complexo III (ubiquinona citocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo oxidase) mais a FoF1-ATP sintase (complexo V), distribuídos ao longo da membrana Fimitocondrial interna (figura 1) (NELSON & COX, 2005).

Os elétrons provenientes dos substratos oxidáveis, NADH e succinato (FADH<sub>2</sub>) entram na cadeia respiratória pela ação de desidrogenases específicas, complexo I ou complexo II. Esses elétrons são em seguida sequencialmente transferidos para: ubiquinona, complexo III, citocromo c, complexo IV e por fim para oxigênio com formação de água. A passagem de elétrons pela cadeia respiratória é dirigido por um potencial redox. Através do fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV há o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas gerando um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, conhecido como força próton motora, que é formada pelo gradiente elétrico (potencial de membrana) e pelo gradiente químico ( $\Delta pH$ ).

Conforme a hipótese quimiosmótica de Mitchell associada com a do acoplamento conformacional de Boyer, o retorno de H<sup>+</sup> para a matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) (MITCHELL, 1961; BOYER *et al.*, 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER *et al.*, 1993; NELSON & COX, 2005).



**Figura 1:** Cadeia de transporte de elétrons clássica e alternativa. Os retângulos vermelhos indicam os componentes alternativos. Adaptado de Rasmusson & Müller, 2006.

A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, demonstrando a presença de complexos I-V, e sugerindo a presença de uma NADH-desidrogenase alternativa interna e outra externa, de uma proteína desacopladora e de uma oxidase alternativa mitocondrial (TUDELLA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2011), formando a via alternativa da cadeia de transporte de elétrons (figura 1). A via alternativa está presente em fungos, leveduras, protozoários e plantas, porém ausente em células de mamíferos, com exceção da proteína desacopladora que pode estar presente na maioria desses organismos.

As NADH desidrogenases alternativas estão descritas em mitocôndrias de plantas e fungos, catalisando a mesma reação redox do complexo I da via clássica. Essas enzimas transferem o elétron do NADH presente na matriz mitocondrial diretamente para a ubiquinona, porém sem o bombeamento de prótons. Além da presença da NADH desidrogenase voltada para a face interna da membrana mitocondrial interna, fungos e plantas podem apresentar uma NADH desidrogenase alternativa voltada para a face externa da membrana



mitocondrial. Essa enzima por sua vez, catalisa a transferência de elétrons do NAD(P)H presente no espaço intermembranas para a ubiquinona, contornando novamente o complexo I. Essas enzimas são insensíveis a rotenona, inibidor clássico do complexo I, mas sensíveis à flavona (MARTINS *et al.*, 2011).

A presença de uma oxidase alternativa (AOX, ubiquinol oxidase resistente ao cianeto) faz com que essa enzima atue como aceptora final de elétrons. A AOX recebe os elétrons provenientes da ubiquinona e os transfere diretamente para o oxigênio, contornando assim dois passos, nos quais ocorrem bombeamento de prótons (complexo III e IV), conseqüentemente há formação de água. Oxidases alternativas são inibidas por ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e ácido benzilhidroxâmico (BHAM), porém, são resistentes ao cianeto, inibidor clássico do complexo IV (MARTINS *et al.*, 2011).

As proteínas desacopladoras (UCPs) são uma classe de proteínas transportadoras de ânions, localizam-se na membrana mitocondrial interna. Essas proteínas estão presentes em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de alguns tecidos não-termogênicos em mamíferos, plantas, fungos e protozoários. Sendo uma proteína transportadora de ânions, as UCPs dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, sem que ocorra a passagem pelo complexo V, produzindo calor ao invés de ATP. Essas proteínas são ativadas por ácidos graxos e sensíveis a nucleotídeos de purina (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011).

As mitocôndrias além de possuírem papel central no metabolismo energético, são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo celular normal, através do escape de elétrons do

complexo I e III, principalmente. As EROs possuem um papel importante em mecanismos fisiológicos de morte celular. Dessa forma, alterações na função mitocondrial têm sido associada a diversas patologias, como: Alzheimer, Parkinson, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, além de atuar também na obesidade e envelhecimento (FINKEL & HOLBROOK, 2000; NELSON & COX, 2005; WALLACE, 2005).

Nos últimos anos cada vez mais estudos tem salientado para a importância das mitocôndrias na resistência a antifúngicos e também na patogênese de fungos em humanos, uma vez que os conhecimentos dessas organelas em fungos patogênicos ainda é limitado (SHINGU-VAZQUEZ & TRAVEN, 2011).

### **1.5. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo**

Nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ( $\text{NADH}$ ) são importantes co-fatores para inúmeros processos celulares, principalmente aqueles envolvidos no metabolismo energético, biossíntese redutora e antioxidação. Esses co-fatores tem sido estudados extensivamente desde de 1930 (HERRERO-YRAOLA *et al.*, 2001; ONYANGO *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2003; YING, 2008).

O  $\text{NAD}^+$  e seus derivados apresentam um papel central como modulador do metabolismo energético celular. Uma vez que a mitocôndria possui em sua matriz, as coenzimas  $\text{NADH}$  e  $\text{NADPH}$ , a qual transferem o hidrogênio para a cadeia respiratória. Nos últimos anos, estudos tem demonstrado a importância da atividade biológica de  $\text{NAD}^+$  e suas isoformas

em outras atividades celulares como a morte celular, a homeostase de cálcio, a expressão gênica, o envelhecimento, a carcinogênese e ainda funções imunológicas. Esses co-fatores atuam ainda em inúmeros processos biológicos e patológicos envolvidos com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dessa forma, a manutenção das concentrações de  $\text{NAD}^+$  e de suas isoformas é importante para a manutenção do metabolismo energético e das funções celulares (YING, 2008; Di STEFANO & CONFORTI, 2013).

Acredita-se que as enzimas envolvidas na biossíntese de  $\text{NAD}^+$  estão localizadas fora da mitocôndria (ANDERSON *et al.*, 2002; HUH *et al.*, 2003). A biossíntese de  $\text{NAD}^+$  possui um papel fundamental no metabolismo das demais isoformas:  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NADPH}$  (YING, 2008).

A via de biossíntese de  $\text{NAD}^+$  foi caracterizada em procariotos (PENFOUND & FOSTER, 1996) e em leveduras (LIN & GUARANTE, 2003; DENU, 2003). Em procariotos e eucariotos inferiores, o  $\text{NAD}^+$  é sintetizado pela via *de novo* do ácido quinolinico e pela via do ácido nicotínico, denominada via *salvage* (PENFOUND & FOSTER, 1996). A via *de novo* inicia-se a partir do triptofano, o qual é convertido a ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN) através de seis reações enzimáticas e uma não enzimática. O NaMN converge para a via *salvage* e sofre ação de duas nicotinamidase formando  $\text{NAD}^+$ . Uma vez sintetizado no citosol, o  $\text{NAD}^+$  deve ser importado para o interior da mitocôndria (YING, 2008; VERDIN, 2014).

Em mamíferos, o  $\text{NADH}$  é capaz de atravessar a membrana mitocondrial externa (LEE *et al.*, 1998). Entretanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  produzidos no citosol (TZAGOLOFF, 1982). A entrada de moléculas hidrofílicas pela membrana interna é catalisada

por uma família de proteínas codificadas no núcleo chamadas de transportadores mitocondriais, as moléculas transportadas por essa família de proteínas são muito variadas em tamanho e estrutura (PALMIERI *et al.*, 2011).

O transportador de malato-aspartato seria o principal responsável pelas alterações na relação  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Esse transportador é encontrado principalmente em mitocôndrias de fígado e rim. Desta forma, os equivalentes redutores do NADH são transferidos para o oxalacetato citosólico produzindo malato, catalisado pela enzima malato desidrogenase citosólica. O malato formado passa através da membrana interna através do transportador malato/ $\alpha$ -cetoglutarato. Na matriz os equivalentes redutores são passados para  $\text{NAD}^+$  pela ação da malato desidrogenase, formando oxalacetato e NADH, o qual pode transferir os elétrons para a cadeia respiratória. O oxalacetato formado não pode voltar diretamente para o citosol, desta forma sofre ação da aspartato aminotransferase formando aspartato. O aspartato por sua vez, pode ser levado para o citosol através do transportador glutamato/aspartato. No citosol o oxalacetato é regenerado (BAKKER *et al.*, 2001).

Em leveduras, além do transportador de malato-aspartato, o NADH pode sofrer oxidação pelas NADH desidrogenases alternativas externas (MARTINS *et al.*, 2011). Além disso, estudos identificaram e caracterizaram duas isoformas de proteína transportadora mitocondrial de  $\text{NAD}^+$  (Ndt1p e Ndt2p) em *Sacharomyces cerevisiae* (TODISCO *et al.*, 2006) e em *Arabidopsis thaliana* (PALMIERI *et al.*, 2009) capazes de transportar estas coenzimas. Estas proteínas possuem massa molecular com aproximadamente 42 e 37,5 kDa para Ndt1p e Ndt2p, respectivamente.

Em estudos prévios no nosso laboratório havíamos observado que em mitocôndrias de *Paracoccidioides brasiliensis*, o  $\text{NAD}^+$  foi capaz de induzir a formação de potencial de membrana mitocondrial (MARTINS *et al.*, 2008), o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Estes mesmos experimentos foram realizados com mitocôndrias de *A. fumigatus* e também sugeriu a presença desse transportador nesse microrganismo. Através de ferramentas de bioinformática, encontramos uma seqüência no genoma de *A. fumigatus*, que possui 32% de identidade com o gene do transportador de dinucleotídeos de nicotinamida (*ndt1*) de *S. cerevisiae* e com 29% de identidade com o gene *ndt1* de *A. thaliana*. A entrada de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  do citosol para a mitocôndria por diferentes mecanismos tem sido atribuído como uma forma de resistência de microrganismos em condições hostis. Desta forma, seria interessante entender o papel desse transportador em *A. fumigatus* e seu potencial quimioterapêutico, uma vez que o desenvolvimento de novas terapias e vacinas para microrganismos oportunistas que possuam um menor efeito adverso ao paciente é necessário.

*2 - Conclusão*

Os resultados apresentados nos permite concluir que:

- A sequência de cDNA obtida pela técnica de PCR-*overlapping* possui 1.194 nucleotídeos que codifica uma proteína com 397 aminoácidos;
- A proteína recombinante Ndt1 expressa em *E. coli* foi purificada dos corpos de inclusão;
- A produção e purificação do anticorpo policlonal anti-Ndt1 apresentou um alto grau de especificidade com a proteína Ndt1;
- A expressão heteróloga da proteína Ndt1 em *S. cerevisiae* comprovou sua atividade como transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo;
- A produção de espécies reativas de oxigênio, superóxido mitocondrial e a determinação de proteínas carboniladas não apresentaram diferença significativa entre as cepas;
- A microscopia confocal confirmou a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias de *S. cerevisiae*.

### *3 - Referências Bibliográficas*



- AABO, T. *et al.* Intracellular pH distribution as a cell health indicator in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Royal Society – Interface**, p. 1-9, 2011.
- ABAD, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 155-182, 2010.
- AGRIMI, G. *et al.* Deletion or Overexpression of Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Carriers in *Saccharomyces cerevisiae* Alters Cellular NAD and ATP Contents and Affects Mitochondrial Metabolism and the Rate Glycolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.7, p. 2239-2246, 2011.
- ANDERSON, R. M. *et al.* Manipulation of a nuclear NAD<sup>+</sup> salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD<sup>+</sup> levels. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n. 20, p. 18881-18890, 2002.
- ANDERSON, R. M. *et al.* Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, n. 423, p. 181-185, 2003.
- ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry**, v. 70, p. 200-214, 2005.
- ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 6102-6109, 2000.
- ASHRAFI, K. *et al.* Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. **Genes Dev.**, v. 14, p. 1872-1885, 2000.

- ATKIN, A. L. Preparation of Yeast Cells for Confocal Microscopy. **From: Methods in Molecular Biology: Confocal Microscopy Methods and Protocols**, v. 122, p. 131-139, 1999.
- BAKKER, B. M. *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.15-37, 2001.
- BAKER, J. L. *et al.* *Streptococcus mutans* NADH Oxidase Lies at the Intersection of Overlapping Regulons Controlled by Oxygen and NAD<sup>+</sup> Levels. **The Journal of Bacteriology**, v. 196, p. 2166-2177, 2014.
- BARROS, M.H. *et al.* Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 49883-49888, 2004.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. *Aspergillus*: biology and industrial applications. **Biotechnology**, v. 23, p. 1-404, 1992.
- BIEGANOWSKI, P. *et al.* Synthetic Lethal and Biochemical Analyses of NAD and NADH Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Establish Separation of Cellular Functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22439-22445, 2006.
- BODEY, G. P.; VARTIVARIAN,S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p.413-437, 1989.
- BONINI, M. G. *et al.* The oxidation of 2'7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophecy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.

- BOYER, P. D. *et al.* A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.70, n.10, p.2837-2839, 1973.
- BOYER, P. D. *et al.* Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.46, p.955-1026, 1977.
- BRAKHAGE, A. A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p.433-455, 2002.
- BROACH, J. R. Nutritional Control of Growth and development in Yeast. **YeastBook Gene Expression & Metabolism**, v. 192, p. 73-105, 2012.
- CANTÓ, C. *et al.* The NAD<sup>+</sup> Precursor Nicotinamide Riboside Enhances Oxidative Metabolism and Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity. **Cell Metabolism**, v. 12, p. 838-847, 2012.
- CAMARGO, J. F.; HUSAIN, S. Immune correlates of protection in human invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases Advance**, p. 1-27, 2014.
- CARDOSO, A. R. *et al.* Mitochondrial compartmentalization of redox processes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 2201-2208, 2012.
- CHAKRABARTI, A. *et al.* Invasive aspergillosis in developing countries. **Medical mycology**, v. 49, p. S35-S47, 2011.
- CHANG, K. Y. *et al.* Detection of alternative splice variants at the proteome level in *Aspergillus flavus*. **Journal Proteome Research**, v.9, p. 1209-1217, 2010.
- CHANG, K. Y.; MUDDIMAN, D. C. Identification of alternative splice variants in *Aspergillus flavus* through comparison of multiple tandem MS search algorithms. **BMC Genomics**, v.12, p. 1-10, 2011.
- CHAUDHARY, N.; MARR, K. A. Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway diseases. **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, p. 1-7, 2011.

- CHEN, T.; ZHANG, M. Pombe: a gene-finding and exon-intron structure prediction system for fission yeast. **Yeast**, v. 14, p. 701-710, 1998.
- CUNHA, F. M.; DEMASI, M.; KOWALTOWSKI, A. J. Aging and calorie restriction modulate yeast redox state, oxidized protein removal, and the ubiquitin-proteasome system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p.664-670, 2011.
- DAGENAIS, T.R.T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p. 447-465, 2009.
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chemica Acta, International Journal of Clinical Chemistry**, v. 329, p. 23-38, 2003.
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- DEMASI, A. P., PEREIRA, G. A., NETTO, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. **FEBS Letter**, v. 509, p. 430-434, 2001.
- DENNING, D. W. Invasive Aspergillosis. **Clinical Infectious Disease**, v.26, p.781-805, 1998.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, p. 1142-1151, 2003.
- DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 195-204, 2010.

- DENU, J. M. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p.41-48, 2003.
- DINAMARCO, T. M. Clonagem, expressão e caracterização do gene da oxidase alternativa mitocondrial de *Aspergillus fumigatus*. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** (Tese de Doutorado), 2008.
- Di STEFANO, M. e CONFORTI, L. Diversification of NAD biological role: the importance of location. **The FEBS Journal**, v.280, p. 4711-4728, 2013.
- DOLLE, C.; RACK, J. G.M.; ZIEGLER, M. NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. **The FEBS Journal Minireview**, v. 280, p. 3530-3541, 2013.
- DU, L. *et al.* Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n. 20, p.18426-18433, 2003.
- FAHEY, J. L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R.. The immunoglobulins of mice. I- Four major classes of imunoglobulins: 7S2-, 7S1-, 1A, 2A- and 18S1M – Globulins. **Journal of Experimental Medicine**, v.120, p. 223-242, 1964.
- FANG, E. F. *et al.* Defective Mitophagy in XPA via PARP-1 Hyperactivation and NAD<sup>+</sup>/SIRT1 Reduction. **Cell**, v. 157, p. 882-896, 2014.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: Molecular mechanisms of import into mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1933, p. 494-502, 2012.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidativ stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FORTÚN, J. *et al.* Aspergillosis. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 4, p. 201-208, 2012.

- GARRIGUES, J. C. *et al.* New in vitro assay based on glucose consumption for determining itraconazole and amphotericin B activities against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n.12, p. 2857-2862, 1994.
- GETZ, E. B. *et al.* A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 73-80, 1999.
- GIANCASPERO, T. A.; LOCATO, V.; BARILE, M. A Regulatory Role NAD Redox Status on Flavin Cofactor Homeostasis in *S. cerevisiae* Mitochondria. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-16, 2013.
- GLAB, N. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 223, p. 24-32, 1990.
- GRÜTZMANN, K. *et al.* Fungal Alternative Splicing is Associated with Multicellular Complexity and Virulence: A Genome-Wide Multi-Species Study. **DNA Research**, v. 21, p.27-39, 2014.
- HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw? **Biocycle**, v.36, n.4, p.32-35, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-619, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. **Free Radicals in Biology and Medicine**, p. 86-187, 1993.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. **Free Radicals in Biology and Medicine**, p. 341-394, 2007.
- HARDJASA, A. *et al.* Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 14, p. 161-164, 2010.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p.1015-1069, 1985.
- HERBRECHT, R. *et al.* Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. **The New England Journal of Medicina**, v. 347, n. 6, p. 408-415, 2002.
- HERRERO-YRAOLA, A. *et al.* Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. **The EMBO Journal**, v.20, n.10, p.2404-2412, 2001.
- HOGABOAM, C.M. *et al.* *Aspergillus* and asthma-any link? *Medical Mycology*, v.43, p.197-202, 2005.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S., LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p. 469-488, 1996.
- HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.11, p.1953-1963, 2007.
- HOMEI, A.; WORBOYS, M. Fungal Disease in Britain and The United States 1850-2000: Aspergillosis: A Disease of Modern Technology. **Palgrave Macmillan**, v. 1, cap. 5, p. 118-136, 2013.
- HOPE. W. W. *et al.* The Initial 96 Hours of Invasive Pulmonary Aspergillosis: Histopathology, Comparative Kinetics of Galactomannan and (133)-D-Glucan,

- and Consequences of Delayed Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p.4879-4886, 2010.
- HORTON, R. M. PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis. **Molecular Biotechnology**, v.3, p. 93-99, 1995.
- HOU, J. *et al.* Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 253-261, 2009.
- HOU, J.; VEMURI, G. N. Using Regulatory information to manipulate glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1123-1130, 2010.
- HUH, W-J.; KANG, S-O. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.13, p.4098-4102, 1999.
- HUH, W-J. *et al.* Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p.2538-2546, 2003.
- IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3604-3608, 1995.
- ITO, J.I.; LYONS, J.M. Vaccination of Corticosteroid Immunosuppressed Mice against Invasive Pulmonary Aspergillosis. **The Journal Infectious Disease**, v.186, p.879-871, 2002.
- JARMUSZKIEWICZ, W. *et al.* Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochimica and Biophysic Acta**, p. 792-799, 2010.
- JUNGHANS, H.; METZLAFF, M. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. **Biotechniques**, v. 8, p.176, 1990.



- KARTSONIS, N. A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.
- KELEMEN, O. *et al.* Function of alternative splicing. **Gene**, v.514, p. 1-30, 2012.
- KEMPKEN, F. Alternative splicing in ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 4235-4241, 2013.
- KOZAK, M. Point mutations define sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v.44, p. 283-292, 1986.
- KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-343, 2009.
- KULAWIAK, B. *et al.* The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1827, p. 612-626, 2012.
- KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLOS Pathogens**, v. 9, p. 1-4, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- LATGÉ, J-P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.355-358, 2002.

- LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.227-231, 1992.
- LEE, J. W. *et al.* Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. **Science Magazine**, v.281, p.64-71, 1998.
- 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.
- LIN, S. J.; GUARENTE, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.241-246, 2003.
- LIN, H.; KWAN, A. L.; DUTCHER, S. K. Synthesizing and Salvaging NAD<sup>+</sup>: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. **PLOS Genetics**, v.6, p.1-15, 2010.
- LONG, M.; DEUTSCH, M. Association of intron phases with conservation at splice site sequence and evolution of spliceosomal introns. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p. 1528-1534, 1999.
- LOUDON, K. W. *et al.* Invasive aspergillosis: clusters and sources? **Journal Medical Microbiology**, v.32, p. 217-224, 1994.
- LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, v.132, p. 2015-2020, 1984.
- LUTTIK, M. A. H. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the

- Oxidation of Cytosolic NADH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24529-24534, 1998.
- MAROBBO, C. M. T.; DI NOIA, M. A.; PALMIERI, F. Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization. **Biochemistry Journal**, v. 393, p. 441-446, 2006.
- MARTINS, V. P. *et al.* Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v.40, p.297-305, 2008.
- MARTINS, V. P. *et al.* Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v. 43, p.81-88, 2011.
- MAYEVSKY, A.; BARBIRO-MICHAELY, E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function *in vivo*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 1977-1988, 2009.
- McGETTRICK, A. F.; WORRALL, D. M. Extraction of Recombinant Protein from Bacteria. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, Human Press Inc., p. 29-35, 2003.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p. 144-148, 1961.
- MORTENSEN, H. D. *et al.* Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hanseii* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 713-719, 2006.

- MOUCHIROUD, L. *et al.* The NAD<sup>+</sup>/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. **Cell**, v. 154, p. 430-441, 2013.
- MUKHOPADHYAY, A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 56, p. 61-109, 1997.
- NAGASAKI, Y. *et al.* Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 379-382, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. **In: Lehninger Principles of Biochemistry**, p. 690-750, 2005.
- NIERMAN, W. C. *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, p.1311-1317, 2005.
- ONYANGO, P. *et al.* SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.99, n.21, p.13653-13658, 2002.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. **Progress in Allergy**, v.15, p. 1-78, 1958.
- PALMIERI, F. *et al.* Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. **FEBS Letters**, v. 417, p. 114-118, 1997.

- PALMIERI, F. *et al.* The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as sole carbon source. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 569-577, 1999.
- PALMIERI, F. *et al.* Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD<sup>+</sup> carrier proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.45, p. 31249-31259, 2009.
- PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Structure and function of mitochondrial carriers – Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. **FEBS Letters**, v. 584, p. 1931-1939, 2009.
- PALMIERI, F. *et al.* Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: review with new insights. **The Plant Journal**, v. 66, p. 161-181, 2011.
- PENFOUND, T.; FOSTER, J. W. NAD-Dependent DNA-Binding Activity of the Bifunctional NadR Regulator of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p.648-655, 1996.
- PETRUSSA, E. *et al.* Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondrial. **FEBS Letters**, v. 307, p. 267-271, 1992.
- PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.32, Suppl 1, p.17-32, 1994.
- RASMUSSEN, A. G.; MÜLLER, I. M. Multiple Energy-Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, 2006.
- REMANI, S. *et al.* The Yeast Mitochondrial Citrate Transport Protein. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 40, p. 577-585, 2008.

- ROZEMA, D.; GELLMAN. S. H. Artificial chaperones: protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 2372-2374, 1995.
- RUNKEL, E. D.; BAUMEISTER, R.; SCHULZE, E. Mitochondrial stress: Balancing friend and foe. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 194-201, 2014.
- SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SHAUKAT, A. *et al.* Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristic. **Mycopathology**, v.129, p.181-188, 2005.
- SHINGU-VAZQUEZ, M.; TRAVEN, A. Mitochondria and Fungal Pathogenesis: Drug Tolerance, Virulence and Potential for Antifungal Therapy. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1376-1383, 2011.
- SLANINOVA, I. HOLUBAROVA A. SVOBODA, A. Immunodetection of spectrin-like proteins in yeasts. **Can J Microbiology**, v. 49, p. 189-196, 2003.
- STAMM, S. *et al.* Function of alternative splicing. **Gene**, v.344, p. 1-20, 2005.
- STANDMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STEINBACH, W. Are We There Yet? Recent Progress in the Molecular Diagnosis and Novel Antifungal Targeting of *Aspergillus fumigatus* and Invasive Aspergillosis. **PLOS Pathogens**, v. 9, p. 1-3, 2013.

STEVENS, D.A. Vaccinate against aspergillosis. A call to arms of the immune system. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.1131-1136, 2004.

SULLIVAN, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D. Fungal Disease of Humans. **In: Fungi**, 2005.

TAUBITZ, A. *et al.* Role of Respiration in the Germination Process of the Pathogenic mold *Aspergillus Fumigatus*. **Current Microbiology**, v.54, p.354-360, 2007.

TODISCO, S. *et al.* Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.3, p.1524-1531, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, T. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.76, P. 4350-4354, 1979.

TREVISAN, G. L. *et al.* Transcription of *Aspergillus nidulans pacC* is modulated by RNA splicing of *palB*. **FEBS Letters**, v.585, p. 3442-3445, 2011.

TUDELLA, V. G. *et al.* In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **The International Journal Biochemistry & Cell Biololy**, v. 36, p.162-172, 2004.

TZAGOLOFF, A. *et al.* Assembly of the mitochondrial membrane System: Processing of the apocytochrome *b* precursor RNAs in *Saccharomyces*

- cerevisiae* D273-10B. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.11, p.6268-6274, 1982.
- VEMURI, G.N. *et al.* Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Process National Academic Science**, v. 104, p. 2402-2407, 2007.
- VERDIER, J. M. *et al.* Preparation and characterization of yeast nuclear extracts for efficient RNA-polymerase B (II)-dependent transcription *in vitro*. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 23, p.7033-7039, 1990.
- VERDIN, E. Coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. **Nature Medicine**, v. 20, p. 25-27, 2014.
- VOULGARIS, I. *et al.* Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? **Scientific Reports**, v. 322, n. 2, p. 1-9, 2012.
- ZIEGLER, M. New functions of long-know molecule: Emerging roles of NAD in cellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1550-1564, 2000.
- ZIEGLER, M. The Adenine Nucleotide Translocase – a Carrier Protein Potentially Required for Mitochondrial Generation of NAD. **Biochemistry**, v. 70, p. 214-219, 2005.
- WALACE, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. **Annual Review Genetics**, p. 339-359, 2005.
- WALLSTRÖM, S. V. *et al.* Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and



metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport.

**Plant and Cell Physiology Advance**, v. 55, p.881-896, 2014.

WALSH, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 327-360, 2008.

WENDLAND, J. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. **Current Genetics**, v. 44, p. 115-123, 2003.

WINGFIELD, P. T. Purification of recombinant proteins. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 601-604, 2002.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 611-637, 2002.

WINGFIELD, P. T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 631-645, 2002.

WRONA, M.; WARDMAN, P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2'7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 657-667, 2006.

WU, G. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. **Journal Biology Chemistry**, v. 281, p. 8788-8795, 2004.

YANG, H. *et al.* Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Levels Dictate Cell Survival. **Cell**, v. 130, 0. 1095-1107, 2007.

YING, W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 179-198, 2008.

YOSHINO, J. *et al.* Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD<sup>+</sup> Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. **Cell Metabolism**, v. 14, p. 528-536, 2011.

YU, J. H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 38, p. 229-237, 2010.