UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Vias alternativas mitocondriais: clonagem e caracterização
bioquímica do gene da NADH desidrogenase alternativa de
A. fumigatus

Anna Carolina de Freitas Policarpo

RIBEIRÃO PRETO
2008

RESUMO

POLICARPO, A.C.F. **Vias alternativas mitocondriais: clonagem e caracterização bioquímica do gene da NADH desidrogenase alternativa de *A. fumigatus***. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Aspergillus fumigatus é um fungo filamentoso e saprofítico encontrado em todas as regiões do mundo. A principal forma de infecção ocorre através da inalação de conídios do fungo com predominância de infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Foi caracterizada a função mitocondrial de *A. fumigatus* e sugeriu-se a presença de vias alternativas, dentre elas, a presença da NADH desidrogenase alternativa. A fim de colaborar com estudos para elucidação do papel desta enzima, foi realizada a clonagem dos genes das NADH desidrogenase alternativa interna e externa de *A. fumigatus*. A análise da seqüência de aminoácidos revelou um perfil de hidropaticidade com a presença de quatro regiões hidrofóbicas, semelhante às outras seqüências já descritas. Além disso, foram identificados dois motivos (GXGXXG) altamente conservados para ligações a nucleotídeos, dentro de um domínio $\beta\alpha\beta$ os quais estão relacionados com a estrutura e atividade da enzima. A seqüência de cDNA do gene *ndhiAf* foi clonada em plasmídeo pYES2 e expressa em *S.*

cerevisiae cepa CEN.PK873-2B; a expressão da NDHIAf foi verificada por técnica de Western-blot. A proteína foi expressa de forma ativa, conferindo à levedura uma respiração e a formação de um potencial de membrana resultantes da oxidação de substratos clássicos do complexo I, sugerindo sua localização na membrana mitocondrial interna. Além disso, as cepas expressando essa proteína foram capazes de crescer em meio contendo apenas lactato como fonte de carbono, uma característica atribuída à presença da NADH desidrogenase alternativa interna (NDHi). Considerando que a atividade das NDHIAf e NDHEAf estão sob controle metabólico, nos avaliamos o efeito de diferentes concentrações de glucose como única fonte de carbono no meio de cultura. Durante a germinação conidial, não foi observada expressão da NDHIAf e NDHEAf na presença de baixas concentrações de glucose. Entretanto, durante a fase de hifas foi observado um aumento na expressão de NDHIAf e NDHEAf. Por outro lado, em alta concentrações de glucose, durante a germinação conidial, foi observado expressão da NDHIAf mas nenhuma expressão da NDHEAf. Na fase de hifas observou-se um aumento da expressão da NDHIAf e uma diminuição da NDHEAf.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*. Mitocôndria. Gene. Glucose. NADH desidrogenase alternativa.

ABSTRACT

POLICARPO, A.C.F. **Alternative mitochondrial pathways: cloning and biochemical characterization of the *A. fumigatus* alternative NADH dehydrogenase gene.** 2008. 130f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Aspergillus fumigatus is a filamentous and saprophytic fungus found in all regions of the world. The main form of infection occurs through inhalation of fungi conidial, with predominance of infections in the respiratory tract, mainly in immunocompromised host. It was characterized the mitochondrial function of *A. fumigatus* and suggested the presence of alternative pathways, including the alternative NADH dehydrogenase. In order to elucidate its role, genes of the external and internal enzymes were cloned. Analysis of the amino acid sequence and hydropathy plot revealed a profile with four hydrophobic regions, similar to other already described sequences. Moreover, two highly conserved motifs (GXGXXG) for the nucleotides interaction, related with the structure and activity of the enzyme, were identified inside the $\beta\alpha\beta$ domain. The sequence of DNA of the *ndh1Af* gene was cloned in an expression plasmid pYES2 and expressed in CEN.PK873-2B *S. cerevisiae* strain; the expression was confirmed by Western-blot analysis. The

protein was expressed in an active form, providing to the yeast an oxygen consumption and a potential membrane formation due to oxidation of the complex I substrate, suggesting its localization in the inner mitochondrial membrane. Moreover, strains expressing this protein were capable of growing in medium with only lactate as a carbon source, a characteristic associated with the presence of internal alternative NADH dehydrogenase (NDHI). Considering that NDHI and NDHE activities are under metabolic control, we evaluated the effect of different concentrations of glucose as the only carbon source in the medium of culture. During conidia germination, it was not observed neither an expression of NDHI nor NDHE in the presence of low concentrations of glucose. However, in hyphae phase was observed an increase an expression of NDHI and NDHE. On the other hand, in high concentration of glucose, during conidia germination was observed an expression of NDHI and not expression of NDHE. In hyphae phase was observed a decrease an expression of NDHI and an increase of NDHE.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*. Mitochondria. Gene. Glucose. Alternative NADH desidrogenase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus é um fungo saprofítico, amplamente distribuído no mundo, que desempenha um papel na reciclagem de carbono e nitrogênio (PITT, 1994; HAINES, 1995; DEBEAUPUIS et al., 1997). Esta espécie habitante do solo coloniza resíduos orgânicos e vegetação deteriorada, sendo as áreas rurais, a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002).

Nos últimos anos, o *A. fumigatus* deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância, para se tornar um dos principais agentes patogênicos. As 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 (LATGÉ, 1999).

Embora as hospitalizações relacionadas com aspergiloses representem pequena parcela, estatísticas mostram que, nos Estados Unidos, o custo total com aspergiloses foi de aproximadamente 633 milhões de dólares em 1996 (STEVENS, 2004).

Dentre os patógenos emergentes o fungo *Aspergillus fumigatus* é um importante causador de micoses sistêmicas, representando a segunda espécie mais notificada em

pacientes imunossuprimidos por transplantes de medula óssea ou de órgãos (WANKE et al., 2000).

Estudos evidenciam que isolados clínicos de *A. fumigatus* diferem acentuadamente de cepas isoladas de amostras de alimentos ou de solo (FRISVAD et al., 1989 *apud* TEPSIC, 1997; VARGA & TOTH, 2003); mostrando que a variabilidade intraespécie é muito elevada (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002).

A biologia deste fungo ainda é pouco conhecida, mas acredita-se que com o esclarecimento de sua sequência genômica (NIERMAN et al., 2005), poderá elucidar os mecanismos de patogenicidade deste fungo.

1.2. Características macro e microscópicas

A identificação do *A. fumigatus* baseia-se predominantemente na morfologia dos conídios, que possuem coloração verde e 2,5 - 3 µm de diâmetro. A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas; as cabeças conidiais, têm ao microscópio óptico, aspectos de vesículas em forma de frasco com uma série de fiálides uniseridas recobrindo dois terços superiores de sua superfície. Suas colônias se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona, à 37°C, apresentando coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios. O *A. fumigatus* é uma espécie termotolerante, podendo crescer em temperaturas até 55°C,

sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies (HAINES, 1995).

1.3. Patogênese

Aspergilose é o termo geral que designa uma doença que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende várias espécies oportunistas que podem causar doenças invasivas, dentre elas, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. nidulans*. Entretanto, aproximadamente 90% dos casos de aspergilose invasiva são causadas pelo *A. fumigatus* (LATGÉ, 1999).

O *A. fumigatus* possui algumas características que contribuem para sua patogenicidade. Além das características microbiológicas do fungo como rápido crescimento e o tamanho reduzido dos conídios que podem penetrar facilmente nos alvéolos pulmonares (PITT, 1994), afetando principalmente o trato respiratório, inúmeros outros fatores de virulência foram caracterizados. Dentre eles pode-se destacar a identificação de um vasto sistema de *turnover* de radicais livres, compreendendo sistemas enzimáticos como: superóxido dismutases, catalases, ascorbato peroxidase, tioredoxina peroxidase, glutathione S-transferase que podem proteger as células do fungo contra os diferentes radicais livres produzidos pelos macrófagos do hospedeiro; além de proteases, ribotoxinas,

fosfolipases, hemolisinas, gliotoxina e outros fatores (STEVENSON, 2004; TEKAIA & LATGÉ, 2005).

Para muitos pacientes, a principal porta de entrada e sítio de infecção do *A. fumigatus* é o trato respiratório. 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, LATGÉ, 1999).

A presença de espécies de *Aspergillus* no meio ambiente é o principal fator de risco para as aspergiloses invasivas nosocomiais. Surto de infecções hospitalares têm sido associados com a construção ou reformas em hospitais, sistemas de ar-condicionado contaminados, entre outros reservatórios no meio ambiente hospitalar (PEGUES et al., 2002).

Os conídios são continuamente inalados, mas geralmente não ocasionam doenças devido à eficiente eliminação pelo sistema imunológico. Para que uma infecção fúngica se desenvolva em um hospedeiro, é necessário que seu sistema imune esteja debilitado no momento da agressão (LATGÉ & CALDERONE, 2002). Assim, muitos fatores de virulência tornam-se importantes quando associados às defesas imunológicas do hospedeiro, acometendo principalmente portadores de doenças que afetam o sistema imunológico ou aqueles submetidos a terapias imunossupressoras (BODEY & VARTIVARIAN, 1989; ITO & LYONS, 2002).

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.

As aspergiloses pulmonares podem ser classificadas de acordo com a localização da doença dentro do trato respiratório, e a existência de uma colonização pelo micélio (BODEY & VARTIVARIAN, 1989; DIXON, 1992; KWON-CHUNG, 1992). As doenças alérgicas, incluindo asma, sinusite alérgica e alveolite ocorrem por exposição aos conídios ou antígenos do *Aspergillus sp* na ausência de colonização pelo micélio, geralmente em pacientes imunocompetentes. As formas mais graves, como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva, a qual representa a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (WANKE et al., 2000), envolvem o crescimento e colonização pelo micélio.

A germinação dos conídios é um elemento chave no ciclo de vida do *A. fumigatus* além de ser um passo crucial no processo infeccioso levando à aspergilose invasiva. Em *A. fumigatus* a principal fonte de energia necessária para a germinação e desenvolvimento do fungo é através da cadeia respiratória mitocondrial (TAUBITZ et al., 2007).

1.4. Função mitocondrial

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, na transmissão de herança genética às células filhas (WESTERMANN et al., 2002), além de estarem intimamente envolvidas no processo de morte celular programada (MACKENZIE & McINTOSH, 1999; LAM et al., 2001; SWIDZINSKI et al., 2004).

A mitocôndria é a organela celular responsável pela síntese, através da fosforilação oxidativa, de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células (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 interconverção 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. Em 1937, com a formulação do ciclo do ácido cítrico por Krebs (KREBS, 1972),

confirmou-se que a fosforilação oxidativa estava associada à respiração de tecidos animais. Em 1948, KENNEDY & LEHNINGER (*apud* LEHNINGER et al., 1993) 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.

A energização das 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). Em mamíferos, 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 a 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 uma via alternativa, o succinato (substrato de sítio II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a 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 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.

Recentemente, foi demonstrado que o consumo de oxigênio e atividade mitocondrial são detectados na fase inicial do processo de germinação e ainda que, a presença de oxigênio e de uma cadeia respiratória funcional são pré-

requisitos para a germinação do fungo *A. fumigatus* (TAUBITZ et al., 2007)

A caracterização da mitocôndria de *A. fumigatus* mostrou a presença dos complexos I-V, e sugeriu a presença de uma NADH-desidrogenase alternativa, de uma proteína desacopladora e de uma oxidase alternativa mitocondrial (TUDELLA et al., 2004).

1.5. Componentes alternativos

Uma importante característica na mitocôndria de plantas (RASMUSSEN et al., 1999; KERSCHER, 2000), fungos (DE VRIES et al., 1988; MELO et al., 2001), eubactérias (MATSUSHITA et al., 1987; BJÖRKLOF et al., 2000;), arqueobactérias (GOMES et al., 2001; BANDEIRAS et al., 2003) e parasitas (BIAGINI et al., 2006) é a presença de enzimas alternativas, como a proteína desacopladora (UCP), a oxidase alternativa (AOX) e a NADH desidrogenase alternativa (NDH) em suas cadeias respiratórias. Pouco se sabe sobre o papel fisiológico destes componentes, mas estudos sugerem que eles estão envolvidos na adaptação destes organismos em ambientes instáveis como estresse ao frio, estresse oxidativo, condições anaeróbias e variações de temperatura (AMORA et al., 2000; CALEGARIO et al., 2003).

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 externamente. Essa enzima alternativa pode estar voltada para a matriz mitocondrial (NADH desidrogenases alternativas internas) ou estar presente no espaço intermembrana (NADH desidrogenases alternativas externas) (KERSCHER, 2000; JOSEPH-HORNE et al., 2001). A NADH desidrogenase alternativa consiste de uma cadeia polipeptídica, sem domínio transmembrana evidente e contém uma molécula de FAD (co-fator de redução) tornando-a capaz de realizar reações de óxido-redução, assim como, o complexo I mitocondrial. Entretanto, diferentemente deste complexo enzimático, a NADH desidrogenase alternativa não contribui para o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, pode competir com o complexo I pelos substratos NADH e ubiquinona na matriz mitocondrial (DEVRIES & MARRES, 1987; YAGI, 1991) e é insensível aos inibidores clássicos do complexo I, como rotenona e piericidina A (KERSCHER, 2000). Porém, esta enzima pode ser inibida por alguns compostos, incluindo os flavonóides (OETTMEIER et al., 1994) e o 1-hidroxi-2-dodecil-4(1H)quinolona (HDQ) (ESCHEMANN et al., 2005).

Estudos realizados em *E. coli* mostraram que a expressão do complexo I ocorre antes da fase exponencial e durante a fase estacionária (WACKWITZ et al., 1999), enquanto, altos níveis de NADH desidrogenase alternativa

são observados durante a fase exponencial (GREEN et al., 1997; MELO et al., 2004).

Recentemente, foi proposto que as NADH desidrogenase alternativas mitocondriais estão relacionadas com um tipo de metabolismo respiro-fermentativo que predomina em diferentes leveduras (TARRIO et al., 2005; TARRIO et al., 2006).

Em *Saccharomyces 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 três 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). Diferentemente, o fungo filamentoso *Neurospora crassa* apresenta, além de um complexo I e das duas NADH desidrogenase alternativas externas (NDE1 e NDE2) e a interna (NDI1), uma terceira NADH desidrogenase alternativa externa (NDE3) que não está exclusivamente localizada na mitocôndria, foi recentemente encontrada no citoplasma do fungo (CARNEIRO et al., 2007).

A expressão heteróloga de SCNDI foi descrita em *E. coli* (KITAJIMA & YAGI, 1998), em células de hamster chinês (SEO et al., 1998) e em células humanas (SEO et al., 1999; BAI et al., 2001) que apresentavam deficiência no complexo I mitocondrial. Foi observado que essa enzima

alternativa comportou-se como um membro da cadeia respiratória das células hospedeiras, permitindo sua sobrevivência, além de melhorar a capacidade de fosforilação oxidativa destas células e, ao mesmo tempo, protegê-las contra estresse oxidativo e morte celular (PARK et al., 2007). Recentemente demonstrou-se o efeito protetor da SCNDI em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, utilizando ratos como modelo experimental. Observou-se que a enzima é capaz de retardar os sintomas da Doença de Parkinson, prevenindo a morte celular e o dano oxidativo do DNA em neurônios (MARELLA et al., 2008).

1.6. Potencial Quimioterapêutico

Atualmente, as principais drogas utilizadas no tratamento da aspergilose invasiva são a anfotericina B e os azóis. Ambos representam as principais drogas utilizadas nestas infecções, atuando na via biossintética do esterol, (LATGÉ & CALDERONE, 2002). A caspofungina, uma nova droga da classe das equinocandinas representa uma alternativa no tratamento destes pacientes (KARTSONIS, 2005). Além disso, recentemente demonstrou-se que novas drogas da classe das equinocandinas, como a micafungina e a anidulafungina foram capazes de inibir o metabolismo de conídios de *Aspergillus* spp (ANTACHPOULOS et al., 2008).

Além disso, foi demonstrado que a fluvastatina, uma droga da classe das estatinas, foi capaz de potencializar a

atividade antifúngica da caspofugina em *A. fumigatus* (NATESAN et al. 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado o potencial antifúngico do voriconazol, um azól de segunda geração, cujo uso terapêutico foi liberado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) para o tratamento de infecções fúngicas, em especial por espécies do gênero *Aspergillus* (KRISHNAN et al., 2005). O posaconazol, uma nova droga da classe dos azóis de segunda geração que possui um amplo espectro antifúngico, demonstrou atividade *in vitro*, *in vivo* e atividade clínica contra vários fungos patogênicos incluindo espécies do gênero *Aspergillus* (ESPINEL-INGROFF A., 1998; PFALLER et al., 2002; SABATELLI et al., 2006; ULLMANN et al., 2007).

Entretanto, apesar de pequenos avanços no tratamento de infecções por fungos filamentosos, a aspergilose invasiva permanece como uma doença oportunista devastadora, presente em cerca de 15% dos pacientes transplantados e com taxa de letalidade variando entre 60 e 90% em pacientes imunocomprometidos (DENNING, 1998; TEKAIA & LATGÉ, 2005).

O aumento do número de infecções fúngicas resistentes a drogas corresponde a um desafio para o tratamento destas infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos.

A descoberta de novos agentes quimioterapêuticos, particularmente aqueles que atuam em diferentes vias metabólicas, juntamente com o melhor entendimento de seus

mecanismos de ação, representam grande importância na terapêutica.

Desta forma, 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 de fungos e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003).

As NADH desidrogenases alternativas podem ser importantes alvos quimioterapêuticos, uma vez que não estão presentes na mitocôndria de humanos (MELO et al., 2004).

A relativa insensibilidade de alguns fungos patogênicos frente à diferentes drogas antifúngicas tem sido atribuída à atividade das vias alternativas respiratórias presente nestes fungos (YUKIOKA et al., 1997).

Nos últimos anos alguns trabalhos descreveram a participação de vias mitocondriais alternativas em processos de resistência a drogas. Através de ensaios enzimáticos com o fungo *Yarrowia lipolytica* demonstrou-se que o 1-hidroxi-2-dodecil-4(1H)quinolona (HDQ) é um composto capaz de inibir a atividade da NADH desidrogenase alternativa deste fungo (ESCHEMANN et al., 2005).

Recentemente, estudos demonstraram que o HDQ possui um eficiente efeito inibitório, em concentrações nanomolares, na replicação de parasitas como o *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (SALEH et al., 2007).

NITLLER et al., (2005) demonstraram o aumento da expressão dos genes da NADH desidrogenase alternativa e oxidase alternativa em *Histoplasma capsulatum* após o tratamento com drogas liberadoras de óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida.

Neste contexto, o estudo da NADH desidrogenase alternativa de *A. fumigatus* pode contribuir para o entendimento de suas funções neste fungo, além de fornecer bases para o desenvolvimento de novos agentes inibidores desta enzima.

2. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir:

- A sequência de aminoácidos da enzima NADH desidrogenase alternativa de *A. fumigatus* apresentou grande similaridade com outras NDHs fúngicas;
- A expressão heteróloga do gene da *ndhiAf* em cepas de *S. cerevisiae* ($\Delta ndi1$) confere a este microrganismo respiração resultante da oxidação de substratos clássicos do complexo I, confirmando a presença desta enzima na membrana mitocondrial interna voltada para a matriz. Além disso, a NDHIAf está envolvido na oxidação de NADH mitocondrial gerado pelo ciclo de Krebs, uma vez que somente as cepas de *S. cerevisiae* expressando este gene, são capazes de crescer em meio contendo apenas lactato como fonte de carbono.
- A disponibilidade da glucose como fonte de carbono, regula a expressão da NDHIAf e NDHEAf em culturas de *A. fumigatus*.
- Nessas mesmas condições, a expressão das NDHIAf e NDHEAf são influenciadas pelas fases inicial e final de crescimento de *A. fumigatus*.

3. BIBLIOGRAFIA

- 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 letters**, Amsterdam, v.477, n.3, p.175-180, jul.2000.
- ALTSCHUL, S.F; MADDEN, T.L; SCHÄFFER, A.A; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids Research**, London, v.25, n.17, p.3389-3402, sep.1997.
- ANTACHOPOULOS, C.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Comparative in vitro pharmacodynamics of caspofungin, micafungin, and anidulafungin against germinated and nongerminated *Aspergillus* conidia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.52, n.1, p.321-328, jan.2008.
- BAI, Y.; HAJEK,P.; CHOMYN, A.; CHAN, E.; SEO, B.B.; MATSUNO-YAGI, A.; YAGI, T.; ATTARDI, G. Lack of Complex I activity un human cells carrying a mutation in MtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (*NDI1*) gene. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.276, n.42, p.38808-38813, oct.2001.
- 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. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1557, n.(1-3), p.13-19, mar.2003.
- BANDEIRAS, T.M.; SALGUEIRO, C.; KLETZIN, A.; GOMES, C.M.; TEIXEIRA, M. *Acidianus ambivalens* type-II NADH dehydrogenase: genetic characterisation and identification of the flavin moiety as FMN. **FEBS letters**, Amsterdam, v.531, n.2, p.273-277, nov.2002.
- BIAGINI, G.A.; VIRIYAVEJAKUL, P.; O'NEILL, P.M.; BRAY, P.G.; WARD, S.A. Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium*

- falciparum* mitochondria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.50, n.5, p.1841-1851, may.2006.
- 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 letters**, Amsterdam, v.467, n.1, p.105-110, feb.2000.
- BODEY, G.P., VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, Berlin, v.8, n.5, p.413-437, may.1989.
- BONNER, W.D.; VOSS, D.O. Some characteristics of mitochondria extracted from higher plants. **Nature**, London, v.191, p.682-684, 1961.
- BORSUK, P.; PRZYKORSKA, A.; BLACHNIO, K.; KOPER, M.; PAWLOWICZ, J.M.; PEKALA, M.; WEGLENSKI, P. L-arginine influences the structure and function of arginase mRNA in *Aspergillus nidulans*. **The Journal of biological chemistry**, Berlin, v.388, n.2, p.135-144, feb.2007.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.70, n.10, p.2837-2839, oct.1973.
- BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNST, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E.; SLATER, E.C. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.46, p.955-1026, 1977.
- BRADSHAW, P.C.; PFEIFFER, D.R. Loss of NAD(H) from swollen yeast mitochondria. **BMC Biochemistry**, London, v.24, n.7, p.1-11, jan.2006.
- BRACHAGE, A.A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: The molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v.56, p.433-455, jan.2002.

- BRAMGL, R. Characteristics of developing mitochondrial genetics and respiratory functions in germinating fungal spores. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.396, n.2, p.175-186, aug.1975.
- CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. **Biochemical Toxicological**, Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.
- 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. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, New York, v.35, n.3, p.211-220, jun.2003.
- CARNEIRO, P.; DUARTE, M.; VIDEIRA, A. The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.30, n.1 p.45-52, jan.2004.
- CARNEIRO, P.; DUARTE, M.; VIDEIRA, A. The external alternative NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*. **Journal of molecular biology**, London, v.368, n.4, p.1114-1121, may.2007.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in enzymology and related subjects of biochemistry**, New York, v.17, p.65-134, 1956.
- DEBEAUPUIS, S.P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGÉ, J.P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and immunity**, Washington, v.65, n.8, p.3080-3085, Aug.1997.
- DENNING, D.W. Invasive Aspergilosis. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v.26, n.4, p.781-805, apr.1998.

- DE VRIES, S.; MARRES, C.A.M. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.895, n.3, p.205-239, 1987.
- DE VRIES, S.; GRIVELL, L. A. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **European journal of biochemistry**, Oxford, v.176, n.2, p.377-384, sep.1988.
- 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*. **European journal of biochemistry**, Oxford, v.203, n.3, p.587-592, feb.1992.
- DIXON, D.D., WALSH, T.J. Human pathogenesis. **Biotechnology**, Stoneham Ma Butterworth-Heinemann, v.23, p.249-467, 1992.
- DUARTE, M.; PETERS, M.; SCHULTE, A., VIDEIRA, A. The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.371, n.3, p.1005-1011, may.2003.
- 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. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.280, n.5, p.3138-3142, feb.2005.
- ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.36, n.10, p.2950-2956, oct.1998.
- FINEL, M. Does NADH play a central role in energy metabolism in *Helicobacter pylori*? **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v.23, n.11, p.412-413, nov.1998.

FRIEDRICH, T.; STEINMULLER, K.; WEISS, H. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria mitochondria and its homologue in chloroplasts. **FEBS letters**, Amsterdam, v.367, n.2, p.107-111, jun.1995.

FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O.; THRANE, U. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.18, n.3, p.331-335, may-jun.1989.

GLAB, N.; WISE, R.P.; PRING, D.R.; 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. **Molecular & general genetics**, Berlin, v.223, n.1, p.24-32, 1990.

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. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, New York, v.33, n.1, p.1-8, feb.2001.

GREEN, J.; ANJUM, M.F.; GUEST, J.R. Regulation of the *ndh* gene of *Escherichia coli* by integration host factor and a novel regulator. **Microbiology**, Washington, v.143, n.9, p. 2865-2875, sep.1997.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: Straw man or fatal flaw. **Biocycle**, v.6, p.32-35, 1995.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto v.54, p.1015-1069, 1985.

ITO, J.I. & LYONS, J.M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v.186, n.6, p.879-871, sep.2002.

- JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.W.; WOOD, P.M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1504, n.2-3, p.179-195, apr.2001.
- KARTSONIS, N.A; SAAH, A.J; JOY, L.C; TAYLOR, A.F; SABLE, C.A. Salvage therapy with caspofungin for invasive aspergillosis: results from the caspofungin compassionate use study. **The Journal of infection**, London, v.50, n.3, p.196-205, apr. 2005.
- KEILIN, D. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animal, yeast, and higher plants. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, London, v.898, p.312-339, 1925.
- KERSCHER, S.J.; OKUN, J.G.; BRANDT, U. A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of cell science**, Cambridge, v.112, p.2347-2354, jul.1999.
- KERSHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1459, n.(2-3), p.274-283, aug.2000.
- KITAJIMA-IHARA, T.; YAGI, T. Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. **FEBS letters**, Amsterdam, v.421, n.1, p.37-40, jan.1998.
- KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, Cambridge, v.44, n.2, p.283-292, jan.1986.
- KREBS, H.A. The history of the triacarbolic acid cycle. **Perspectives in biology and medicine**, Chicago, v.14, p.154-170, 1972.

KRISHNAN, S; MANAVATHU, E.K; CHANDRASEKAR, P.H. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v.55, n.6, p.914-920, jun.2005.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A.; EDMAN, J. C.; BENNETT, J.E. Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium. **Journal of medical and veterinary mycology**, Oxford, v.30, p.61-69, n.1, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5258, p.680-685, aug.1970.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature.**, London, v.411, n.6839, p.848-853, jun.2001.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.12, n.2, p.310-350, apr.1999.

LATGÉ, J.P. & CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Current opinion in microbiology**, London, v.5, n.4, p.355-58, aug.2002.

LEHNINGER, A.L. Oxidative phosphorylation. **Harvey lectures**, New York, v.49, p.176-215, 1955.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Principles of Biochemistry**. ed.3. São Paulo: SARVIER, 1993. p.542-597.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 2000. 975 p. Tradução de: Principles of biochemistry.

- LENDERBERG, E.M; COHEN, S.N. Transformation of *Salmonella thphimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. **Journal of bacteriology**, Washington, v.119, n.3, p.1072-1074, sep.1974.
- LESK, A.M. NADH-binding domains of dehydrogenases, introduction to protein architecture: The structural biology of proteins. **Oxford Univ. Press.**, Oxford, p.217-227, 2001.
- LI, L.; BRUNK, B.P.; KISSINGER, J.C.; PAPE, D.; TANG, K.; COLE, R.H; MARTIN, J.; WYLIE, T.; DANTE, M.; FOGARTY, S.J.; HOWE, D.K.; LIBERATOR, P.; DIAZ, C.; ANDERSON, J.; WHITE, M.; JEROME, M.E.; JOHNSON, E.A.; RADKE, J.A.; STOECKERT, C.J. JR.; WATERSTON, R.H.; CLIFTON, S.W.; ROOS, D.S.; SIBLEY, L.D. Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. **Genome research**, Cold Spring Harbor N.Y., v.13, n.3, p.443-454, mar.2003.
- 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. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.273, n.38, p.24529-24534, sep.1998.
- MACKENZIE, S.; McINTOSH, L. Higher plant mitochondria. **The Plant cell**, Rockville, v.11, n.4, p.571-586, apr.1999.
- MARELLA, M.; SEO, B.B.; NAKAMARU-OGISO, E.; GREENAMYRE J.T.; MATSUNO-YAGI, A.; YAGI, T. Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v.3, n.1, p.e1443, jan.2008.
- 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*. **European journal of biochemistry**, Oxford, v.195, n.3, p.857-862, feb.1991.

- MATSUSHITA, K.; OHNISHI, T.; KABACK, H.R. NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. **Biochemistry**, Washington, v.26, n.24, p.7732-7737, dec.1987.
- MELO, A.M.P.; DUARTE, M.; VIDEIRA, A. Primary structure and characterization of a 64kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1412, n.3, p.282-287, aug.1999.
- 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. **The Journal of biological chemistry**, Berlin, v.276, n.6, p.3947-3951, feb.2001.
- MELO, A.M.; BANDEIRAS, T.M.; TEIXEIRA, M. New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v.68, n.4, p.603-616, dec.2004.
- MEZEI, L.M & STORTS, D.R. **PCR technology: current inovation**. Flórida: CRC-Press, 1994.
- MICHALECKA, A.M.; AGIUS, S.C.; MØLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G. Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. **The Plant journal**, Oxford, v.37, n.3, p.415-425, feb.2004.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, London, v.191, p.144-148, jul.1961.
- MORRISON, D.A. Transformation in *Escherichia coli* preservation of competent cells. **Methods in enzymology**, New York, v.68, p.326-331, 1977.

NATESAN, S.K.; CHANDRASEKAR, P.H.; ALANGADEN, G.J.; MANAVATHU, E.K. Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus* in vitro. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.60, n.4, p.369-373, apr. 2008.

NIERMAN, W.C.; PAIN, A.; ANDERSON, M.J.; WORTMAN, J.R.; KIM, H.S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D.B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P.S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T.V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCIA, J.L.; GARCIA, M.J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G.H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMENEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFON, A.; LATGE, J.P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W.H.; MAY, G.S.; MILLER, B.L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYNIA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PENALVA, M.A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B.L.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M.A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G.D.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; RODRIGUEZ-PENA, J.M.; RONNING, C.M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, M.; SANCHEZ-FERRERO, J.C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; VAZQUEZ DE ALDANA, C.R.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J.H.; FRASER, C.; GALAGAN, J.E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARRELL, B.; DENNING, D.W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**. London, v.438, n.7071, p.1151-1156, dec.2005.

NIHEI, C.; FUKAI, Y.; KITA, K. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1587, n.(2-3), p.234-239, jul.2002.

NIHEI, C.; KUKAI, 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 letters**, Amsterdam, v.538, n.(1-3) p.35-40, mar.2003.

NITTLER, M.P.; HOCKING-MURRAY, D.; FOO, C.K.; SIL, A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, v.16, n.10, p.4792-4813, oct.2005.

OETTMEIR, W.; MASSON, K.K.; SOLL, M.; REIL, E. Acridones and quinolones as inhibitors of ubiquinone functions in the mitochondrial respiratory chain. **Biochemical Society transactions**, London, v.22, n.1, p.213-216, feb.1994.

OHNISHI, T.; KAWAGUCHI, K.; HAGIHARA, B. Preparation and some properties of yeast mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.241, n.8, p.1797-1806, apr.1966.

PAHLMAN, I.L.; LARSSON, C.; AVERET, N.; BUNOUST, O.; BOUBEKEUR, S.; GUSTAFSSON, L.; RIGOLET, M. Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.277, n.31, p.27991-27995, aug.2002.

PARK, J.S.; LI, Y.F.; BAI, Y. Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1772, n.5, p.533-542, may.2007.

PEGUES, D.A.; LASKER, B.A.; MCNEIL, M.M.; HAMM, P.M.M.; LUNDAL, J.L.; KUBAK, B.M. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v.34, n.3, p.412-416, feb.2002.

PEREIRA, M.M.; BANDEIRAS, T.M.; FERNANDES, A.S.; LEMOS, R.S.; MELO, A.M.P.; TEIXEIRA, M. Respiratory chains from aerobic thermophilic prokaryotes. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, New York, v.36, n.1, p.93-105, feb.2004.

- PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; NAGY, G.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondria. **FEBS letters**, Amsterdam, v.307, n.3, p.267-71, aug.1992.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HUYNH, H.; HOLLIS, R.J. Clinical evaluation of a frozen commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of seven antifungal agents, including the new triazoles posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.40, n.5, p.1694-1697, may.2002.
- PITT, J.I. The current role of *Aspegillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of medical and veterinary mycology**, Oxford, v.32, n.1, p.17-32. 1994.
- RAPISARDA, V.A.; CHEHIN, R.N.; DE LAS RIVAS, J.; RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.; FARIAS, R.N.; MASSA, E.M. Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v.405, n.1, p.87-94, sep.2002.
- 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. **The Plant journal**, Oxford, v.20, n.1, p.79-87, oct.1999.
- SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P.A.; MENDRICK, C.A.; NORRIS, C.C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T.A.; MCNICHOLAS, P.M. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.50, n.6, p.2009-2015, jun.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, n.4732, p.1350-1354, dec.1985.

SALEH, A.; FRIESEN, J.; BAUMEISTER, S.; GROSS, U.; BOHNE, W. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.51, n.4, p.1217-1222, apr.2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed 2, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, v.1-3, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467; dec.1977.

SCHMID, R.; GERLOFF, D.L. Functional properties of the alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling. **FEBS letters**, Amsterdam, v.578, n.1-2, p.163-168, dec.2004.

SCHMIT, J.C.; BRODY, S. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. **Bacteriology**, Washington, v.40, n.1, p.1-41, mar.1976.

SCHWITZGUEBEL, J.P.; PALMER, J.M. Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 149, n.2, p.612-619, feb.1982.

SEO, B.B.; KITAJIMA-IHARA, T.; CHAN, E.K.; SCHEFFLER, I.E.; MATSUNO-YAGI, A.; YAGI, T. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, n.16, p.9167-9171, aug.1998.

SEO, B.B.; MATSUNO-YAGI, A.; YAGI, T. Modulation of oxidative phosphorylation of human kidney 293 cells by transfection with the internal rotenone-insensitive NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1412, n.1, p.56-65, may.1999.

SMALL, W.C.; MCALISTER-HENN, J. Identification of cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.180, n.16, p.4051-4055, aug.1998.

STADE, S.; BRAMBL, R. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: Respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.147, p.757-767, 1981.

STEVENS, D.A. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **clinical infectious diseases**, chicago, v.38, n.8, p.1131-1136, apr.2004.

SWIDZINSKI, J.A.; LEAVER, C.J.; SWEETLOVE, L.J. A Proteomic analysis of plant programmed cell death. **Phytochemistry**, New York, v.65, n.12, p.1829-1838, jun.2004.

TARRIO, N.; DIAZ PRADO, S.; CERDAN, M.E.; GONZALEZ S.M.I. Isolation and characterization of two nuclear genes encoding glutathione and thioredoxin reductases from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1678, n.(2-3), p.170-175, may.2004.

- TARRIO, N.; DIAZ, P.S.; CERDAN, M.E.; GONZALEZ, S.M.I. The nuclear genes encoding the internal (KlNDI1) and external (KlNDE1) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1707, n.2-3, p.199-210, may.2005.
- TARRIO, N.; BECERRA, M.; CERDAN, M.E.; GONZALEZ, S.M.I. Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS yeast research**, Amsterdam, v. 6, n.3, p.371-80, may.2006.
- TAUBITZ, A.; BAUER, B.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Current microbiology**, New York, v.54, n.5, p.354-360, may.2007.
- TEKAIA, F. & LATGÉ, J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Current opinion in microbiology**, London, v.8, n.4, p.385-392, aug.2005.
- TEPSIC, K.; CIMERMAN, N.G.; FRISVAD, J.C. Growth and micotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains isolated from a Saltern. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.157, p. 9-12, 1997.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, sep.1979.
- TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; SORIANI, F. M.; SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A. *In situ* evidence of alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Exeter, v.36, n.1, p.162-172, jan.2004.

- ULLMANN, A.J.; KRAMMES, E.; SOMMER, S.; BUSCHMANN, I.; JAHN-MUEHL, B.; CACCIAPUOTI, A.; SCHMITT, H.J. Efficacy of posaconazole and amphotericin B in experimental invasive pulmonary aspergillosis in dexamethasone immunosuppressed rats. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v.60, n.5, p. 1080-1084, nov.2007.
- 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. **Medical mycology**, Oxford, v.36, n.5, p.299-303, oct.1998.
- VARGA, J.; TOTH, B. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v.3, n.1, p.3-17, may.2003.
- VIDEIRA, A.; DUARTE, M. From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1555, n.1-3, p.187-191, sep.2002.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, ed.2. New York, John Wiley & Sons Inc., 2000.
- VON JAGOW, G.; KLINGENBERG, M. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v.12, n.3, p.583-592, feb.1970.
- WACKWITZ, B.; BONGAERTS, J.; GOODMAN, S.D.; UNDEN, G. Growth phase-dependent regulation of nuoA-N expression in *Escherichia coli* K-12 by the Fis protein: upstream binding sites and bioenergetic significance. **Molecular & general genetics**, Berlin, v.262, n.4-5, p.876-883, dec.1999.
- WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.1, p.153-158, 2000.
- WARBURG, O. The chemical constitution of respiration ferment. **Science**, Washington, v.68, n.1767, p.437-443, nov.1928.

WESTERMANN, B.; PROKISC, H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. **Fungal genetics and biology**, Orlando, v.36, n.2, p.91-97, jul.2002.

WIERRENGA, R.K.; TERPSTRA, P.; HOL, W.G.J. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. **Journal of molecular biology**, New York, v.187, n.1, p.101-107, jan.1986.

YAGI, T. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, New York, v.23, n.2, p.211-225, apr.1991.

YAGI, T.; DI BERNARDO, S.; NAKAMARU-OGISO, E.; KAO, M.C.; SEO, B.B.; MATSUNO-YAGI, A. NADH dehydrogenase (NADH:quinone oxidoreductase), p.15-40. In. ZANNONI, D. (ed.). *Respiration in Archaea and Bacteria*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, v.1, 2004.

YATZKAN, E.; YARDEN, O. The B regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for completion of macroconidiation and other developmental processes in *Neurospora crassa*. **Molecular microbiology**, Boston, v.31, n.1, p.197-209, jan.1999.

YE, D.; LEE, C.H.; QUEENER, S.F. Differential splicing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase pre-mRNA. **Gene**, Amsterdam, v.263, n.1-2, p.151-158, jan.2001.

YUKIOKA, H.; TANAKA, R.; INAGAKI, S.; KATOH, K.; MIKI, N.; MIZUTANI, A.; MASUKO, M.; KUNOH, H. Mutants of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* deficient in alternative, cyanide-resistant, respiration. **Fungal genetics and biology**, Orlando, v.22, n.3, p.221-228, dec.1997.