UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Clonagem, expressão e caracterização do gene
da oxidase alternativa mitocondrial de
Aspergillus fumigatus

Taís Magnani Dinamarco

RIBEIRÃO PRETO
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taisa Magnani Dinamarco

Clonagem, expressão e caracterização da oxidase alternativa mitocondrial de *Aspergillus fumigatus*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Sérgio Akira Uyemura

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

SUMÁRIO

Resumo	i
<i>Abstract</i>	iii
Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. Introdução	01
<i>Aspergillus fumigatus</i>	02
Características macro e microscópicas	03
Patogênese	04
Função mitocondrial	06
Oxidase Alternativa	09
Danos Oxidativos	12
Potencial quimioterapêutico da oxidase alternativa	13
Análise da função gênica	15
2. Objetivos	21
3. Material e métodos	24
3.1 Cultivo do <i>Aspergillus fumigatus</i>	25
3.2 Isolamento do DNA	25
3.3 Determinação da concentração e pureza do DNA	26
3.4 Gene da oxidase alternativa de <i>A. fumigatus</i>	27
3.4.1 Digestão do DNA genômico de <i>A. fumigatus</i> com diferentes enzimas de restrição	27
3.4.2 Eletroforese em gel de agarose	27
3.4.3 <i>Southern blotting</i>	28
3.4.4 Marcação do fragmento com ³² P	28
3.4.5 Hibridação com a sonda radiomarcada	30
3.4.6 Construção da biblioteca parcial de DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	31

3.4.6.1	Preparo do plasmídeo BlueScriptII KS ⁺	31
3.4.7	Inserção dos fragmentos de DNA em plasmídeos	31
3.4.8	Preparo de células competentes	32
3.4.9	Transformação de células competentes	33
3.4.10	Preparação em pequena escala de DNA plasmideal	33
3.4.11	Digestão do plasmídeo com enzima de restrição	35
3.4.12	Preparo e sequenciamento das amostras selecionadas	35
3.4.13	Extração de RNA, quantificação e eletroforese	35
3.4.14	RT-PCR	36
3.5	Expressão heteróloga do gene <i>aoxAf</i>	38
3.5.1	Desenho dos <i>primers</i> para clonagem em plasmídeo de expressão	38
3.5.2	Reações em cadeia da polimerase (PCR)	38
3.5.3	Clonagem do gene <i>aoxAf</i> em plasmídeo de expressão pYES2	39
3.5.4	Análise da clonagem do gene <i>aoxAf</i> no pYES2	40
3.5.5	Preparo de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes e transformação	41
3.5.6	Indução da expressão do gene <i>aoxAf</i> em <i>S. cerevisiae</i>	42
3.5.7	Produção de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> e purificação de mitocôndrias	43

3.5.8	Preparo das amostras para a análise eletroforética em SDS-PAGE	45
3.5.9	SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio)	46
3.5.10	<i>Western Blot</i>	47
3.5.11	Avaliação da taxa de crescimento das cepas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. cerevisiae/aoxAf</i>	49
3.5.12	Determinação da concentração de proteínas (método de Biureto)	49
3.6	Medidas do consumo de oxigênio	49
3.7	Avaliação da expressão e da atividade da oxidase alternativa na presença de radicais livres	50
3.8	Interferência por RNA	51
3.8.1	Amplificação das sequências invertidas	51
3.8.2	Clonagem no vetor pALB1	52
3.8.3	Produção de esferoplastos de <i>A. fumigatus</i>	53
3.8.4	Transformação de <i>A. fumigatus</i>	54
3.8.5	Seleção dos clones positivos para a RNAi	55
3.9	Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT-PCR")	55
3.10	Determinação da produção de ERO em conídios de <i>A. fumigatus</i>	59
3.11	Determinação da viabilidade de conídios de <i>A. fumigatus</i> através de citometria de fluxo	59
3.12	<i>Killing</i> por macrófagos	60
3.13	Análises estatísticas	62

4. Resultados	64
4.1. Cultivo de <i>A. fumigatus</i>	65
4.2. Extração do DNA de <i>A. fumigatus</i>	65
4.3. Construção da biblioteca genômica parcial de <i>A. fumigatus</i>	66
4.4. Análise do sequenciamento dos clones positivos	68
4.5. Análise molecular da oxidase alternativa de <i>A. fumigatus</i>	72
4.6. Comparação entre as oxidases alternativa de fungos e plantas	75
4.7 Expressão heteróloga da oxidase alternativa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucarioto	79
4.7.1 Clonagem da <i>aoxAf</i> em plasmídeo de expressão pYES2	79
4.7.2 Avaliação da atividade da oxidase alternativa em <i>S. cerevisiae</i>	80
4.7.3 Avaliação do crescimento das cepas de <i>S. cerevisiae</i> em meio não fermentativo e com inibição da cadeia respiratória	84
4.7.4 Imunodeteção da AOXAf com anticorpos específicos anti-oxidase alternativa de <i>Sauromatum guttatum</i>	86
4.8 Avaliação da expressão e da atividade da oxidase alternativa na presença de radicais livres	87
4.9 Interferência por RNA	90
4.9.1 Produção dos fragmentos do gene <i>aoxAf</i> para clonagem no vetor pALB1	90
4.9.2 Seleção dos clones positivos para RNAi	91

4.10	Determinação da produção de ERO em cepas com RNAi	94
4.11	Determinação da viabilidade dos conídios de <i>A. fumigatus</i> na presença de radicais livres	97
4.12	Validação do alvo quimioterapêutico .	102
5.	Discussão	106
6.	Conclusões	126
7.	Referências Bibliográficas	129
	Apêndice(s)	156
	Anexo(s)	177

Resumo

MAGNANI, T. **Clonagem, expressão e caracterização do gene da oxidase alternativa mitocondrial de *Aspergillus fumigatus***. 2008. 199f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentoso e saprofítico, encontrado em todas as regiões do mundo, desempenhando um importante papel na reciclagem de carbono e nitrogênio do solo. A principal forma de infecção ocorre através da inalação dos conídios com predominância de infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, que revelou a presença de uma respiração resistente a cianeto mediada pela oxidase alternativa. A clonagem e sequenciamento deste gene foram realizadas através de *screening* de uma biblioteca de DNA genômico. O alinhamento das sequências genômica e de cDNA mostrou a presença de dois introns, que após *splicing* codifica uma proteína contendo 352 aminoácidos, possuindo uma massa molecular estimada de 40,84 kDa e um *pI* teórico de 9,51. Além disso, foram identificados domínios altamente conservados (LET, NERMHL, LEEA e RADE-H) que interagem com átomos de ferro e estão contidos em α -hélices propostas como responsáveis pela organização estrutural da enzima. A fim de caracterizar bioquimicamente esta proteína, a sequência de cDNA do gene foi clonada em plasmídeo pYES2 e expressa em *S. cerevisiae* INVSc1 como um modelo eucarioto. Após expressão, a proteína encontrou-se de forma ativa, conferindo à levedura uma respiração resistente a cianeto. Esta característica herdada provocou uma discreta diminuição na taxa de crescimento em meio não-fermentativo e uma capacidade de sobrevivência na presença de KCN. Acredita-se que a atividade das AOXs esteja diretamente relacionada com a presença de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO). Neste contexto, a avaliação do efeito de diferentes agentes pró-oxidantes provocou um aumento na atividade e na expressão da enzima. Paralelamente, a caracterização funcional do gene foi realizada através da técnica de interferência por RNA, utilizando o vetor de expressão pALB1. Em meio contendo maltose, as cepas pALB1/aoxAf

apresentaram coloração branca devido ao silenciamento do gene *alb1*. Os níveis de mRNA do gene *aoxAf* foram determinados por *Real time RT-PCR*, mostrando o eficiente silenciamento do gene alvo com a construção utilizada. Devido à relação já descrita entre ERO e a atividade das AOXs, avaliou-se a produção de espécies reativas de oxigênio nas cepas silenciadas utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA, observando maior produção na cepa pALB1/*aoxAf*. Além disso, a viabilidade destas cepas foi determinada por citometria de fluxo após a exposição com agentes pró-oxidantes, a qual indicou maior letalidade na cepa pALB1/*aoxAf*, quando comparada com CEA e pALB1. Da mesma forma, após a incubação dos conídios das cepas silenciadas com macrófagos de camundongos foi verificada uma maior atividade microbicida dos macrófagos na cepa duplamente silenciada pALB1/*aoxAf*, quando comparada com as outras cepas. Com estes resultados podemos concluir que a oxidase alternativa apresenta uma importante atividade antioxidante, além de contribuir nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção de *A. fumigatus*.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus*, mitocôndria, oxidase alternativa, estresse oxidativo.

Abstract

MAGNANI, T. **Cloning, functional expression, and biochemical characterization of an alternative oxidase mitochondrial gene from *A. fumigatus***. 2008. 199f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The saprophytic species *Aspergillus fumigatus* is a deuteromycete fungus found worldwide, which has an essential role in recycling carbon and nitrogen. Following inhalation of conidia by the immunocompetent host, the innate cellular immune system is responsible for killing the conidia, exposing them to reactive oxygen. However, *A. fumigatus* is capable of surviving and replicating within the phagolysosomal compartment of immunocompromised macrophages. It was previously demonstrated that *A. fumigatus* mitochondria possess an alternative oxidase (*aoxAf*) which is a cyanide-resistant protein. A partial genomic DNA library was screened to cloning an *aoxAf* gene. The alignment between the cDNA and genomic DNA sequences revealed the existence of two introns which after *splicing* encodes a 352 amino acid sequence with a calculated molecular mass of 40 kDa and a theoretical *pI* of 9.51. The deduced amino acid sequence revealed four regions completely conserved among the AOXs sequences (LET, NERMHL, LEEA and RADE-H), where six conserved amino acids residues are proposed to be a metal ligand site. To characterize the AOX protein, a cDNA of *aoxAf* gene was cloned into pYES2 plasmid and transformed in *S. cerevisiae* INVSc1. After the incubation of the cells in a nonfermentable medium in the presence of KCN, *S. cerevisiae* expressing AOX was able to grow, while it was lethal for the control yeast. These results suggest that the recombinant AOXAf is properly targeted to the *S. cerevisiae* mitochondria where it has functional activity. Studies with different species demonstrated that AOX is induced by a variety of treatments usually labeled as stresses. To verify the function of AOX in *A. fumigatus* under oxidative stress conditions, conidia were treated with different donors of ROS. These treatments caused an increase in *aoxAf* activity and transcription levels. To identify

genetically attributes of virulence and oxidative defense in *A. fumigatus*, we construct a RNA interference plasmid. Two inverted repeated sequences of conserved region of an interest gene were amplified and cloned in pALB1 plasmid. In maltose medium pALB1 and pALB1/*aoxAf* transformants demonstrated white colonies, attributable to the reduction of *alb1* gene expression. The *aoxAf* mRNA levels were analyzed by Real time RT-PCR, showing an efficient alternative oxidase gene silencing in pALB1 plasmid construction. It was previously demonstrated that ROS can stimulate the AOXs activity, so, we used the dye CM-H₂DCFDA to measure ROS production in RNAi transformants, showing that the decrease in *aoxAf* gene expression caused an increase in ROS production. After incubation with ROS donors the viability of these strains was determined by flow cytometry analysis. The pALB1/*aoxAf* strain showed higher lethality, when compared with CEA and pALB1, suggesting the involvement of AOX in antioxidant defense in *A. fumigatus*. Besides, ROS produced by alveolar macrophages play an essential role in the killing of *A. fumigatus* conidia. In the same way, phagocytosis assay revealed that pALB1/*aoxAf* strain was more lethal than CEA and pALB1. With these results, we concluded that alternative oxidase is an efficient antioxidant system and might contribute with defense mechanism of *A. fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, mitochondria, alternative oxidase, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 01:	Figura ilustrativa da cadeia respiratória mitocondrial de plantas e fungos. Estão representadas a via clássica de transferência de elétrons e as vias alternativas mitocondriais	08
Figura 02:	Mecanismos de silenciamento gênico de interferência por RNA	18
Figura 03:	Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos de um fragmento amplificado por PCR a partir do DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	29
Figura 04:	Construção utilizada na RNAi	52
Figura 05:	Fotografia da eletroforese em gel de agarose do DNA extraído de <i>A. fumigatus</i>	66
Figura 06:	Filme radiográfico exposto à membrana de nylon hibridada com a sonda	67
Figura 07:	Análise da sequência pelo programa Blastx, dos clones enviados para sequenciamento	69
Figura 08:	Sequência nucleotídica do gene da oxidase alternativa de <i>A. fumigatus</i> com a dedução dos aminoácidos codificados	71
Figura 09:	Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de oxidase alternativa de diferentes fungos	74
Figura 10:	Comparação entre os perfis de hidropaticidade entre sequências deduzidas de aminoácidos de oxidases alternativa de diferentes fungos	75
Figura 11:	Alinhamento das sequências de proteína de oxidases alternativa de plantas e fungos	78
Figura 12:	Fotografia do gel de SDS-PAGE referentes à fração solúvel de <i>S. cerevisiae</i> submetidos à indução da expressão da proteína AOXAf com galactose 2% (p/v), à 30°C	81

Figura 13:	Efeito de inibidores sobre o consumo de oxigênio em <i>S. Cerevisiae</i>	83
Figura 14:	Fotografia de uma cultura de 48 horas em diferentes diluições das cepas de <i>S. cerevisiae</i> , <i>Sc/pYES2</i> e <i>Sc/pYESaoxAf</i>	85
Figura 15:	Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida e do <i>Western blot</i> do isolado de mitocôndria de <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 16:	Indução da respiração resistente a cianeto em cultura de <i>A. fumigatus</i> cultivado na presença de paraquat e menadiona. A atividade da oxidase alternativa foi determinada polarograficamente em meio de respiração	88
Figura 17:	Nível de expressão do gene <i>aoxAf</i> em culturas de <i>A. fumigatus</i> expostas a paraquat e menadiona. Os resultados foram normalizados pelo nível de expressão do gene constitutivo β -tubulina	89
Figura 18:	Esquema da estrutura <i>stem-loop</i> para a RNAi. O esquema mostra a dupla fita de RNA formada após transcrição do plasmídeo <i>pALB1/aoxAf</i>	90
Figura 19:	Fotografia dos clones cultivados em meio mínimo contendo xilose ou maltose	92
Figura 20:	Nível de expressão do gene <i>aoxAf</i> nos clones CEA e <i>pALB1/aoxAf</i> cultivados em meio indutor de RNAi	93
Figura 21:	Cinética da medida da geração de ERO em conídios de <i>A. fumigatus</i>	95
Figura 22:	Comparação entre a fluorescência inicial (T_0) e final (T_{3600}), nas cepas CEA, <i>pALB1</i> e <i>pALB1/aoxAf</i>	96
Figura 23:	Características do volume (<i>FSC</i> , eixo x) e complexidade celular (<i>SSC</i> , eixo y) dos conídios de <i>A. fumigatus</i> cepa CEA	98

Figura 24:	Incorporação das sondas fluorescentes FUN [®] -1 (eixo x) e PI (eixo y) em conídios da cepa CEA, pALB1 e pALB1/ <i>aoxAf</i>	100
Figura 25:	Comparação entre a viabilidade dos conídios das cepas CEA, pALB1 e pALB1/ <i>aoxAf</i> , após a exposição com antimicina A, paraquat e H ₂ O ₂	101
Figura 26:	Fotografia representativa da fagocitose da cepa pALB1/ <i>aoxAf</i> por macrófagos	103
Figura 27:	Avaliação da eficiência da atividade microbicida nas cepas CEA, pALB1 e pALB1/ <i>aoxAf</i> .	104

Lista de Tabelas

Tabela 1:	<i>primers</i> utilizados para amplificação do fragmento de DNA utilizado como sonda ...	29
Tabela 2:	<i>primers</i> utilizados para amplificação e inserção de sítios de restrição no gene <i>aoxAf</i> para posterior clonagem em plasmídeo de expressão	38
Tabela 3:	<i>primers</i> utilizados na amplificação das sequências repetidas invertidas do gene <i>aoxAf</i> para clonagem em plasmídeo pALB1 ..	51
Tabela 4:	<i>primers</i> utilizados em experimentos de <i>Real time-PCR</i>	56
Tabela 5:	Diluições do DNA genômico para construção de uma curva de calibração dos <i>primers</i>	58

Lista de abreviaturas

1 Kb Plus	Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases
ADP	Adenosina 5' difosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
aoxAf	Gene da oxidase alternativa de <i>A. fumigatus</i>
AOXAf	Proteína-oxidase alternativa de <i>A. fumigatus</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CM-H₂DCFDA	(5,6)-chlorometil-2,7-diacetato diclorodihidrofluoresceína
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
D.O.	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
HEPES	Ácido N-(2 hidróximetil) piperazina-N'-(4-2etanossulfônico)
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazóli
ORF	Fase aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
PI	Iodeto de propídio
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Interferência por RNA
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
SC-URA⁻	Meio de cultura Sc sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SHAM	Ácido salicil hidroxâmico
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano

1. Introdução

Nos últimos anos, a incidência de infecções invasivas causadas por fungos oportunistas aumentou drasticamente devido ao frequente uso de terapias imunossupressoras, do aumento dos casos de AIDS e de transplantes de medula óssea (BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002; TEKAIA & LATGÉ, 2005; SINGH & PATERSON, 2005). Diferentes espécies de fungos são regularmente identificadas como causadoras de doenças nesses pacientes. Dentre os patógenos emergentes o fungo *Aspergillus fumigatus* é um importante causador de micoses sistêmicas, representando uma das espécies mais notificadas em pacientes imunossuprimidos, sendo a principal causa de mortalidade e morbidade (WANKE et al., 2000; HOHL & FELDMESSER, 2007).

Aspergillus fumigatus

Nas duas últimas décadas, o fungo filamentoso *A. fumigatus* deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância para os pesquisadores para se tornar um dos principais agentes patogênicos. 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 sobrevive e cresce em vegetais em decomposição, portanto, áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; De

VRIES & VISSER, 2001; BRAKHAGE & LANGFELDER et al., 2002).

A biologia deste fungo ainda é pouco conhecida, mas o esclarecimento do genoma do *A. fumigatus* (NIERMAN et al., 2005) possibilitará os estudos de estrutura e função de genes, favorecendo a elucidação dos mecanismos de patogenicidade deste fungo.

Características macro e microscópicas

As colônias do *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em meio rico 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 e septadas com paredes paralelas; as cabeças conidiais apresentam aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides unisseriadas, 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. O *A. fumigatus* é uma espécie termo-tolerante, podendo crescer em temperaturas de até 55°C e sobreviver em até 75°C (BEFFA et al., 1998; RYCKEBOER et al., 2003), sendo esta uma característica

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

Patogênese

O estabelecimento de uma infecção fúngica, bem como seu desenvolvimento em tecidos hospedeiros requer que o fungo seja agressivo no momento em que o sistema imune do hospedeiro esteja debilitado (LATGÉ & CALDERONE, 2002). Desta forma, o estado imunológico do hospedeiro influencia diretamente as infecções fúngicas, incidindo principalmente em portadores de doenças que afetam o sistema imunológico ou aqueles submetidos a terapias imunossupressoras (ITO & LYONS, 2002; HOGABOAM et al., 2005; HOHL & FELDMESSER, 2007).

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; SHAUKAT et al., 2005). Na maioria dos pacientes, a principal forma de infecção do *A.*

fumigatus ocorre por inalação de conídios, afetando principalmente 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).

As formas clínicas que se desenvolvem durante a infecção pelo gênero *Aspergillus* incluem as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, que 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 envolvem o crescimento e colonização pelo micélio (BODEY & VARTIVARIAN, 1989).

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, o trato gastro-intestinal e os rins, sendo a forma disseminada, geralmente, aguda e fatal.

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).

Função mitocondrial

A mitocôndria é a organela celular responsável, através da fosforilação oxidativa, pela síntese 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).

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). 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 do complexo 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 segunda via, o succinato (substrato do complexo 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 sequencialmente aos complexos III, citocromo c, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água (BOYER et al., 1977; 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).

Diferentemente de mamíferos, a caracterização da mitocôndria de *A. fumigatus* realizada em nosso laboratório, demonstrou além dos complexos I-V, a presença de vias alternativas no fluxo de elétrons mitocondrial (Figura 01). Desta forma, foi sugerida a presença de NADH-desidrogenases alternativas, de uma proteína desacopladora e de uma oxidase alternativa mitocondrial (TUDELLA et al., 2004).

Figura 01: Figura ilustrativa da cadeia respiratória mitocondrial de plantas e fungos. Estão representadas as via clássica de transferência de elétrons e as vias alternativas mitocondriais.

Oxidase alternativa

A mitocôndria de todos os eucariotos conhecidos possui o citocromo c oxidase, componente terminal da cadeia respiratória, responsável pela reação em que os elétrons resultantes da oxidação do substrato pelas desidrogenases, reduzem o oxigênio molecular em água.

Alguns organismos contêm uma segunda oxidase, a oxidase alternativa (AOX), que também catalisa a transferência de elétrons e a redução do oxigênio à água. O fluxo de elétrons desta via alternativa ramifica-se da via de transferência de elétrons convencional (frequentemente referida como via do citocromo) no nível da ubiquinona (SIEDOW & UMBACH, 2000). A transferência de elétrons através da oxidase alternativa não está acoplada ao bombeamento de prótons, desta forma dois dos três sítios de conservação de energia são desviados e a energia livre liberada é dissipada como calor. Essa oxidase alternativa é resistente a inibidores que agem no complexo III (mixotiazol e antimicina A) e IV (cianeto) da cadeia respiratória, mas pode ser inibida especificamente por compostos que possuem estruturas similares à ubiquinona (MINAGAWA et al., 1997), incluindo o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o N-

propil galato (MOORE et al., 1991; SIEDOW & UMBACH, 1995).

A oxidase alternativa é encontrada nas mitocôndrias de plantas, bem como em moluscos, cordados (McDONALD & VANLERBERGHE, 2005), protozoários (SUZUKI et al., 2004) além de em alguns fungos (BERTHOLD et al., 2000), como *Candida parapsilosis* (MILANI et al., 2001).

Tem sido sugerida como uma das funções da AOX a manutenção do fluxo respiratório quando o metabolismo respiratório normal é perturbado por alguma razão ou caso a via normal de transferência de elétrons esteja saturada (MOORE et al., 1991).

Em plantas, embora o significado fisiológico ainda permanecer desconhecido, acredita-se que sua função esteja relacionada a condições de estresse, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), sugerindo a importância para os processos de aclimatização (BORECKÝ & VERCESI, 2005; NOCTOR et al., 2007). Neste sentido, foi sugerida uma importante interação entre cloroplastos e mitocôndria, uma vez que o aumento na expressão da AOX ocorre em situações climáticas com excesso de luminosidade (NOGUCHI &

TERASHIMA, 2006; YOSHIDA et al., 2007). Embora existam poucos estudos relacionando a atividade da AOX em eventos de necrose, já foi descrito que sua super-expressão em plantas reduz a progressão da morte celular, decorrente da redução da via mitocondrial do citocromo *c* e da produção de espécies reativas de oxigênio (ORDOG et al., 2002; SUGIE et al., 2007).

Em *A. niger*, foi verificada a expressão da oxidase alternativa em todos os estágios de crescimento, de conídio até micélio, sugerindo a importante função da AOX no metabolismo celular e na redução de ERO desde o estágio inicial da diferenciação (HATTORI et al., 2008). Além disso, a produção de ácido cítrico em *A. niger*, importante para uso industrial, é um produto formado a partir do metabolismo celular com comprovada contribuição da oxidase alternativa (KIRIMURA et al., 2000).

Alguns inibidores da via respiratória do citocromo oxidase têm mostrado uma indução na transcrição do gene da AOX em fungos (SAKAJO et al., 1991) e plantas (VANLERBERGHE et al., 1997) aumentando os níveis de síntese da enzima. As variações de fatores externos como baixas temperaturas, infecções por patógenos e estresse oxidativo também podem

influenciar na expressão do gene da oxidase alternativa (VANLERBERGHE et al., 1997; MAGNANI et al., 2007), mostrando que a principal função da via alternativa é diminuição de ERO geradas na mitocôndria (WAGNER et al., 1997).

Danos oxidativos

O interesse pelos eventos de estresse oxidativo aumentou devido a sua relação com diversas doenças como as neurodegenerativas, câncer, aterosclerose, dentre outras. O estresse oxidativo ocorre como consequência do desbalanço na homeostase de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN) desencadeando danos oxidativos nos constituintes celulares (JEZEK & HLAVATÁ, 2005).

Acredita-se que as mitocôndrias sejam uma das principais produtoras de ERO, sendo que a maior produção ocorre no complexo I e III mitocondrial, principalmente quando a via clássica de transferência de elétrons encontra-se inibida (TURRENS & BOVERIS, 1980; GRIGOLAVA et al., 1980; SKULACHEV, 2005). Além disso, sugere-se que o aumento na produção de ERO seja proporcional às lesões celulares e morte celular (HARMAN, 1956, 1981, 1998).

Os efeitos deletérios resultantes da formação de ERO nas mitocôndrias são prevenidos por vários sistemas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutational peroxidase, dentre outras (TURRENS, 2003).

Em plantas e fungos, o aumento na expressão da AOX sugere o papel desta enzima na diminuição do acúmulo e na formação de ERO, diminuindo os danos oxidativos (MAXWELL et al., 1999; JOSEPH-HORNE et al., 2001; MOORE et al., 2002; UMBACH et al., 2005).

Neste contexto, a ação preventiva exercida pela oxidase alternativa na formação de ERO nas mitocôndrias (WAGNER, 1995; MAXWELL et al., 1999; DUFOUR et al., 2000) parece ser a principal função desta via em plantas e em outros microrganismos (WAGNER & MOORE, 1997; MAGNANI et al., 2007). Desta forma, oxidases alternativas podem ser alvos atrativos importantes no desenvolvimento racional de quimioterápicos, pois esta enzima não está presente em mamíferos (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003; SEN & MAJUMDER, 2008).

Potencial quimioterapêutico da oxidase alternativa

Sistemas metabólicos de parasitas são alvos atrativos para a quimioterapia devido ao papel essencial destes na sobrevivência e adaptação dos patógenos em ambientes hostis, como anaerobiose ou estresse oxidativo. Outro fator de importância quimioterapêutica é a diferença entre os sistemas metabólicos dos parasitas e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003; CHAUDHURI et al., 2006).

Estudos mostraram que a inibição da oxidase alternativa de *Trypanosoma brucei brucei*, utilizando inibidores específicos como, ascofuranona, SHAM (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003) e derivados sintéticos do SHAM (OTT et al., 2006), causaram uma diminuição no crescimento *in vitro* e *in vivo* do parasita. A AOX foi demonstrada ser essencial em alguma fase de diferenciação do parasita, pois a sua inibição foi suficiente para comprometer o desenvolvimento do microrganismo (NIHEI et al., 2002; NIHEI et al., 2003).

Mutantes de *Podospora anserina* com deficiência em subunidades do citocromo oxidase demonstraram uma indução na expressão do gene da oxidase alternativa e subsequentemente, uma diminuição na geração de ERO (OSIEWACZ, 2002).

Em *Candida albicans*, as variações de pH provocaram a indução ou inibição da expressão da AOX relacionando o papel desta enzima nos processos de diferenciação celular (KONNO et al., 2006).

Após a exposição a eventos de estresse oxidativo mediado pela inibição do transporte de elétrons por antimicina A, cianeto de potássio ou por agentes pró-oxidantes, demonstrou-se aumento na transcrição do gene da oxidase alternativa em *Acanthamoeba castellanii* (CZARNA et al., 2005) e em fungos, como por exemplo, *Histoplasma capsulatum* (JOHNSON et al., 2003) e *A. fumigatus* (MAGNANI et al., 2007).

Análise da função gênica

O tratamento da aspergilose invasiva, assim como de outras micoses, é restrito a um número limitado de medicamentos e dentre eles os azóis e a anfotericina B representam os mais utilizados nestas infecções (LATGÉ & CALDERONE, 2002; CHRYSSANTHOU, et al., 2008). 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* ssp (ANTACHOPOULOS et al., 2008). Devido à resistência adquirida pelo fungo a estes antifúngicos, torna-se necessária a busca exaustiva por novos fármacos mais específicos para o microrganismo e de menor toxicidade para o paciente (SANGLARD, 2002).

O desenvolvimento e a implementação de antifúngicos eficazes tornam-se trabalhosos devido à similaridade entre a organização celular do fungo e de seu hospedeiro (RAMSDALE, 2008).

Inúmeros modelos, *in vitro* ou *in vivo*, baseados em estudos de perda de função de diferentes genes têm provado ser muito úteis no entendimento das bases moleculares das doenças e na identificação de possíveis alvos quimioterapêuticos.

As análises genômicas funcionais dependem de metodologias eficientes para a inativação do gene estudado. Dentre os modelos de inativação gênica, a interferência por RNA (RNAi) apresenta um grande potencial, pois baseia-se na introdução de RNA dupla

fita (dsRNA), micro-RNAs (miRNAs), pequenos fragmentos de RNA (siRNAs) nas células, causando a degradação do mRNA e desencadeando um processo de repressão da expressão de sequências homólogas (VERMA et al., 2004; HAYAFUNE et al., 2006). O processo de silenciamento gênico mediado por RNAi pode ser didaticamente dividido em duas etapas: a primeira envolve a ligação de uma RNA nuclease (DICER) à um grande fragmento de dsRNA e sua clivagem em pequenos fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos (siRNA); na segunda etapa, estes siRNAs interagem com um complexo multinuclease denominado RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA), o qual é ativado por ATP e é responsável por desfazer a dupla fita dos siRNA. Assim, os siRNA direcionam o complexo RISC para o mRNA alvo, que é então clivado pela ação de endoribonucleases (Argonaute) e degradado por exoribonucleases (XRN-1, ERI-1), resultando na perda de função do gene (MEISTER & TUSCHL, 2004; LIU, 2008; GABEL & RUVKUN, 2008).

A RNAi possui um processo de amplificação de sinal mediado por uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). Esta enzima utiliza os siRNAs como *primers* para a síntese da dupla fita de RNA e o próprio RNA alvo como molde. Desta maneira, formam novos dsRNAs

que sofrem a ação do DICER, formando um ciclo e amplificando o efeito de silenciamento gênico (Figura 02).

Figura 02: Diferentes formas de silenciamento por RNA. a) moléculas de dsRNA provenientes de transcritos complementares ou estruturas em grampo (*stem-loop*) são reconhecidas pelo DICER e clivadas em pequenos RNAs (siRNA). A RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) atua na amplificação do sinal de interferência por produzir fitas complementares da molécula de RNA alvo utilizando os siRNAs como *primers* e produzindo mais cópias de dsRNA homólogo. b) O complexo RISC, associado com um siRNA, promove o silenciamento de diversas formas. Em todas as formas, o siRNA confere especificidade, enquanto as proteínas do RISC atuam ou recrutam efetores para o silenciamento. c) O RISC associa-se ao RNAm alvo e o "quebra". d) Uma variante do RISC pode induzir TGS utilizando a especificidade do siRNA para silenciar diretamente a cromatina por modificações nos loci homólogos. e) O RISC com o siRNA associado interage com a região UTR do transcrito alvo, bloqueando sua tradução (mecanismo desconhecido) (ALMEIDA & ALLSHIRE, 2005).

Desde a descoberta da RNAi em *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998), inúmeros estudos têm sido realizados em diferentes patógenos, como *Neurospora crassa* (COGONI, 1997; NOLAN et al., 2008), *Magnaporthe oryzae* (MURATA et al., 2007), *Schistosoma mansoni* (NABHAN et al., 2007), *Entamoeba histolytica* (KAUR et al., 2004), dentre outros.

Em *C. albicans*, a metodologia *antisense* selecionou 86 genes essenciais para o crescimento do fungo (De BACKER et al., 2001). A inativação do gene α -(1,3)-glucana sintase por RNAi em *H. capsulatum* promoveu um fenótipo idêntico àquele gerado em cepas *knock-out*, ou seja, cepas com virulência atenuada (RAPPLEYE et al., 2004).

A RNAi tem sido utilizado na caracterização de genes envolvidos na virulência do *A. fumigatus*, como o silenciamento simultâneo de 3 genes de isoenzimas *ppo* (psi-produtoras de oxigenases) cujos produtos atuam ativando o sistema imunológico do hospedeiro e retardando a patogênese do fungo (TSITSIGIANNIS et al., 2005).

Desta forma, o silenciamento de genes em *A. fumigatus* relacionados à sobrevivência do fungo em situações de estresse, seja no meio ambiente ou no hospedeiro mamífero, representa uma grande ferramenta para a validação destes genes como alvos quimioterapêuticos.

2. Objetivos

Para o melhor entendimento das vias alternativas mitocôndrias de *A. fumigatus*, os principais objetivos deste trabalho foram:

1- Estudos moleculares: clonagem, sequenciamento do gene da oxidase alternativa e interferência por RNA;

2- Estudos bioquímicos realizados pela expressão heteróloga da AOX em *S. cerevisiae* e caracterização em *A. fumigatus*.

3. Material e métodos

3.1 Cultivo do *A. fumigatus*

O isolado clínico de *A. fumigatus* foi cedido pela Dra. Cláudia O. Rodrigues da University of Miami, Flórida, EUA. As cepas foram inoculadas em meio sólido de YG e após 48 horas de crescimento à 37°C, foram mantidas à 4°C.

3.2 Isolamento do DNA

A extração do DNA de *A. fumigatus* foi realizada de acordo com o método de VAN BURIK et al. (1998) com modificações. Uma cultura de *A. fumigatus* foi mantida 48 horas à 37°C em meio sólido de YG, ressuspensa em tampão PBS estéril e adicionadas a 200 mL de meio YG líquido. Esta cultura foi mantida com agitação constante de 150 rpm durante 24 horas à 37°C. Após este período, o micélio foi coletado através de filtração a vácuo, seco em papel de filtro estéril e colocado em gral estéril. Foi congelado com nitrogênio líquido e macerado com pistilo. O procedimento de maceração e congelamento foi realizado por mais 6 vezes até a obtenção de um pó homogêneo. Foram adicionados 1 a 2 mL de tampão de extração, RNase A 60 µg/mL, proteinase K 200 µg/mL e SDS 0,4% (p/v).

Incubou-se a mistura por 12 horas a 56°C e após este período realizou-se um tratamento com fenol tamponado (v/v) e centrifugação a 2.000g por 15 minutos, por 3 vezes, a 25°C. À fase aquosa obtida, adicionou-se igual volume de clorofórmio, com homogeneização por inversão. Após centrifugação de 2.000g durante 10 minutos, a fase aquosa foi coletada e adicionada de 10% (v/v) de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol absoluto. Após suave homogeneização, observou-se a formação de um precipitado fibroso correspondendo ao DNA. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado e após secagem, à temperatura ambiente, foi ressuspenso em água deionizada estéril e mantido a 4°C.

3.3 Determinação da concentração e pureza do DNA

A determinação da concentração e pureza do DNA foi realizada de acordo com o método de SAMBROOK et al. (1989), através da relação entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}).

3.4 Gene da oxidase alternativa de *A. fumigatus*

3.4.1 Digestão do DNA genômico de *A. fumigatus* com enzimas de restrição

O DNA genômico foi totalmente digerido as diferentes enzimas de restrição *XbaI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *XhoI/EcoRI*, *XhoI*, de acordo com SAMBROOK et al., (1989). Os tampões utilizados foram aqueles recomendados pelo fabricante.

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). O gel de agarose 1,0% foi preparado em tampão TAE e as amostras foram preparadas através da adição de uma mistura contendo azul de bromo-fenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v) e glicerol 30% (p/v). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, utilizando-se 90 V, durante 1 hora. Os géis foram corados por imersão em uma solução contendo brometo de etídio (0,25 µg/mL) por 45 minutos e em seguida, lavados com água deionizada.

3.4.3 Southern Blotting

As amostras de DNA digeridas pelas enzimas de restrição, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) e transferidas para uma membrana de nylon HyBond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech) (SOUTHERN, 1975). Inicialmente, o gel foi colocado em uma solução de HCl 0,1 mol/L durante 20 minutos para depurinação e em seguida lavado com água destilada. O gel foi colocado em um tampão contendo NaOH 0,4 mol/L e NaCl 1,5 mol/L para desnaturação do DNA, e em seguida neutralizado em solução contendo NaCl 1,5 mol/L e Tris-HCl 0,5 mol/L pH 8,0. O gel foi colocado em um suporte, ao qual foi sobreposta uma membrana de nylon, papel de filtro e camadas de papel toalha. Após 12 horas de transferência, a membrana foi lavada com NaCl 1,5 mol/L e Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 8,0, seca e irradiada com UV_{254nm} durante 30 segundos para fixação do DNA na membrana.

3.4.4 Marcação do fragmento com ³²P

Uma sequência de DNA de *A. fumigatus*, com 450 pb (Figura 03) foi previamente obtida em nosso laboratório através de técnicas de PCR, utilizando a combinação de *primers*:

Tabela 1: primers utilizados para amplificação do fragmento de DNA usado como sonda

Faox:	5' - gtggctggcgtaccaggcattggtg - 3'
Raox	5' - gcccgactgctccgtttcgtggcg - 3'

V A G V P G M V G G M L R H L R S L R R
gtggctggcgtgccaggcattggttggagggatgctgaggcattgctgaggagcttgagacga
M K R D N G W I E T L L E E A Y N E R M
atgaagagggacaacggatggattgaaactcttcttgaggaggcatacaatgagcgcatg
H L L T F L K L A E P G W F M R L M V L
catttgcttaccttcctcaagcttgctgagccaggtggttcattgctgactcatggttctc
G A Q G V F F N G F F L S Y L I S P R T
ggagcccaaggcgtcttcttcaatgggttcttcttccatacctgatttccccacgcacc
C H R F V G Y L E E E A V I T Y T R A I
tgccaccggttcggttggttaccttgaagaagaagccgtcatcacctacactcgggccatc
K D I E T G K L P D W E K L D A P E I A
aaagatataggagacaggaaagctgcccgattgggagaagttggatgctcccgagatcgcc
V Q Y W N M P E G Q R K M R D L L L Y V
gtccagtactggaatatgcccgaggggagcgcaagatgagagacttattgctgtacgtg
R A D E A K H R
cgggctgacgagggcaaagcaccgc

Figura 03: Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos de um fragmento amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *A.fumigatus*.

Esta sequência apresentou uma elevada identidade com as oxidases alternativas de outras espécies, e desta forma, foi utilizada como sonda, a partir da marcação com ³²P (FEINBURG & VOGELSTEIN, 1983; FEINBURG & VOGELSTEIN, 1984). O fragmento foi desnaturado através de incubação a 94°C por 10 minutos, e incubado em um meio contendo tampão

apropriado, hexadeoxiribonucleotídeos 26 UA₂₆₀/mL, BSA livre de ácido graxo 400 µg/mL, dNTP 20 µmol/L e [α -³²P] dCTP 333 nmol/L, 50 µCi. (volume final de 50 µL). Iniciou-se a reação pela adição de Fragmento maior (Klenow) da DNA polimerase 5 U. Os nucleotídeos radioativos não incorporados foram removidos utilizando-se uma coluna de Sephacryl® S-400 (Clontech) centrifugável.

3.4.5 Hibridação com a sonda radiomarcada

A membrana de nylon foi pré-incubada por 5 horas em uma solução contendo SDS 7% (p/v) e fosfato de sódio 250 mmol/L (pH 7,2). Em seguida, a sonda desnaturada foi adicionada e o sistema incubado a 65°C durante 12 horas, sob agitação. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão SSC de crescente estringência (1°-2x SSC, 0,1% SDS (p/v); 2°-1x SSC, 0,1% SDS (p/v); 3°-0,1x SSC, 0,1% SDS (p/v)). Um filme radiográfico, -MAT (Kodak), foi exposto à membrana marcada radioativamente e mantido a -70°C, para posterior revelação.

3.4.6 Construção da biblioteca parcial de DNA genômico de *A. fumigatus*

Uma biblioteca genômica parcial foi construída em plasmídeo BlueScriptII (pBSII KS⁺-Stratagene) com os fragmentos de DNA identificados no *Southern blotting*.

3.4.6-1 Preparo do plasmídeo BlueScriptII KS⁺

Aproximadamente 15 µg do plasmídeo BlueScriptII (pBSII KS⁺-Stratagene) foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas. A digestão foi realizada a 37°C por duas horas em tampão recomendado pelo fabricante. Após a digestão total, os plasmídeos foram precipitados pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol absoluto e mantido a -20°C por 12 horas. Após este período, a mistura foi centrifugada a 20.400g por 20 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v). O plasmídeo linearizado foi seco à temperatura ambiente.

3.4.7 Inserção dos fragmentos de DNA em plasmídeos

O plasmídeo linearizado pBSII KS⁺ foi incubado com os fragmentos de DNA previamente digeridos, na

proporção 2:1 (inserto:vetor) pmoles de pontas coesivas, juntamente com T₄ DNA ligase 1 U e tampão de ligação recomendado pelo fabricante. A reação foi realizada pela incubação da mistura reacional por 24 horas a 14°C.

A clonagem do gene amplificado por técnicas de PCR foi incubado com 10 ng/ μ L plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) (Apêndice 4) e mantido por 12 horas à temperatura ambiente em uma solução apropriada.

3.4.8 Preparo de células competentes

As células competentes foram produzidas de acordo com LENDERBERG & COHEN (1974) e MORRISON (1977). Células de *Escherichia coli*, cepas DH5- α , foram semeadas de estoques a -70°C ou de placas conservadas na geladeira, em 5 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação 150 rpm por 12 horas. Em seguida, os 5 mL da cultura foram adicionados a 500 mL do mesmo meio LB e novamente incubadas nas mesmas condições anteriores até uma densidade ótica entre 0,6 e 0,7, em comprimento de onda a 600 nm.

A cultura foi mantida no gelo por 5 minutos, centrifugada a 1.000g por 10 minutos a 4°C. As células

foram lavadas com 100 mL de MgCl_2 0,1 mol/L gelado, centrifugadas novamente por 10 minutos, ressuspensas em 100 mL de CaCl_2 0,1 mol/L gelado, mantidas no gelo por 20 minutos, centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em 21,2 mL de CaCl_2 0,1 mol/L gelado e 3,8 mL de glicerol 80% (v/v) estéril.

As células foram aliquotadas e armazenadas a -70°C .

3.4.9 Transformação de células competentes

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

A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 45 segundos. Após este tempo, as células foram colocadas em gelo novamente e adicionadas de 250 μL do meio SOC. A suspensão de células foi agitada à 37°C a 225 rpm por 1 hora. As células foram semeadas em meio LB sólido contendo antibiótico apropriado.

3.4.10 Preparação em pequena escala de DNA plasmideal

A extração do plasmídeo foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada colônia selecionada foi semeada separadamente em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido adicionado do antibiótico apropriado e cultivada sob agitação de 150 rpm por 12 horas a 37°C. Cerca de 1,5 mL da suspensão de células de cada tubo foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 20.400g por 1 minuto a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de extração de plasmídeos e foram adicionados 1 µL RNase A 10 µg/mL e 200 µL de uma solução de NaOH 0,2 N/SDS 0,1% (p/v). A mistura foi homogeneizada gentilmente por inversão 4-5 vezes. Foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3,0 mol/L, pH 5,4. A suspensão foi centrifugada a 20.400g por 15 minutos à 4°C. Ao sobrenadante foram adicionados 400 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada em agitador mecânico. Após centrifugação a 20.400g por 4 minutos a 4°C, a fase aquosa foi coletada e o DNA plasmideal foi precipitado pela adição de 1,0 mL de etanol absoluto e mantidos a -70°C por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 20.400g por 15 minutos a 4°C. O sedimento contendo o

DNA plasmídeo foi lavado com etanol 75% (v/v), seco e ressuspenso em água deionizada estéril.

3.4.11 Digestão do plasmídeo com enzima de restrição

A digestão do plasmídeo com enzima de restrição foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada 1 µg de DNA foi digerido com 4 U de enzima de restrição para garantir a digestão de todo plasmídeo da reação. A enzima utilizada para a reação de digestão foi *EcoRI* e a digestão foi realizada à 37°C por 2 horas. A análise da digestão foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.4.12 Preparo e sequenciamento das amostras selecionadas

As amostras selecionadas foram preparadas para a reação de sequenciamento segundo SANGER et al. (1977), utilizando-se as instruções do kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

3.4.13 Extração de RNA, quantificação e eletroforese

Os RNAs de diferentes culturas foram extraídos utilizando o reagente de Trizol® (Invitrogen). Cerca

de 5×10^6 a 1×10^7 conídios, recuperados de uma cultura líquida, foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em gral com pistilo. Após a maceração, foi adicionado 1 mL de reagente Trizol® e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada vigorosamente. Após centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C, transferiu-se a fase aquosa superior para outro tubo contendo 500 μ L de isopropanol. Novamente, incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (p/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água-DEPC.

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

3.4.14 RT-PCR

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

Cerca de 20 µg de RNA foram incubados a 37°C por 2 horas com 5 U de DNase I livre de RNase (Promega) em um volume final de 100 µL contendo DTT 5 mmol/L, 1 µL de RNase OUT (inibidor de RNase recombinante - Invitrogen) e o tampão apropriado da enzima. Para verificar a eficiência do tratamento com DNase I, foi realizada a PCR para o gene constitutivo do fragmento 18S do RNA ribossômico de *A. fumigatus*.

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

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

de 5 U de transcriptase reversa *SuperScriptTMII*. Após a adição da enzima, a mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 75°C. A reação foi terminada com adição de 2 U de RNase H e incubação a 37°C por 20 minutos.

3.5 Expressão heteróloga do gene *aoxAf*

3.5.1 Desenho dos *primers* para clonagem em plasmídeo de expressão

As sequências dos *primers* foram desenhadas de tal forma a inserir sítios de restrição no gene da *aoxAf* amplificado, para posterior clonagem em plasmídeo de expressão. A Tabela 2 representa os *primers* desenhados, com sítios de restrição inseridos destacados em negrito.

Tabela 2: *primers* utilizados para amplificação e inserção de sítios de restrição no gene *aoxAf* para posterior clonagem em plasmídeo de expressão.

pYESaoxAf-F	5' - CC GAATTC AACATGGACTCGATAACAGCAACC - 3' EcoRI
pYESaoxAf-R	5' - ACAAA TCTAGA GAATCAAATCACCTCTTCTCT - 3' XbaI

Os sítios de restrição de enzimas, inseridos na sequência estão destacados em negrito.

3.5.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas de acordo com SAIKI et al., (1985) e MEZEI & STORTS (1994), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Mastercycler Eppendorf). O DNA plasmídeo contendo o gene *aoxAf* clonado (50 ng) foi incubado em um meio contendo, os *primers* pYESaoxAf-F 0,8 µmol/L, pYESaoxAf-R 0,8 µmol/L, dNTP 0,2 mmol/L, MgSO₄ 2 mmol/L e tampão 1X (volume final de 50 µL), em seguida desnaturado através da incubação a 94°C durante 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 U da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e realizada com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 68°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto, com repetição de 30 ciclos.

3.5.3 Clonagem do gene *aoxAf* em plasmídeo de expressão pYES2® (Invitrogen)

A sequência de cDNA do gene *aoxAf* foi amplificado com os *primers* descritos na Tabela 2. O plasmídeo pYES2 (Apêndice 5) e o gene amplificado foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* de acordo com SAMBROOK et al. (1989) durante 2 horas a

37°C. Os tampões utilizados foram aqueles recomendados pelo fabricante.

O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos de interesse foram extraídos do gel. Essa extração foi realizada cortando-se o fragmento do gel contendo a banda de tamanho desejado, em seguida o DNA foi eluído do gel por centrifugação a 2.700g por 5 minutos em colunas de sílica (Micropore).

Estes fragmentos de DNA extraídos foram ligados pela reação da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) por 12 horas a 16°C, com uma relação de número de pontas entre inserto e plasmídeo de 3/1 pmoles. Na reação foram utilizados 0,2 U de enzima, 4,0 µL de tampão de ligação e água deionizada completando volume final de 20 µL.

3.5.4 Análise da clonagem do gene *aoxAf* no pYES2

Bactérias *E. coli* DH5- α foram transformadas com 2,0 µL das reações de ligação (item 3.4.9) e em seguida o plasmídeo foi extraído de acordo com o item 3.4.10.

A análise da clonagem do gene no plasmídeo foi realizada por digestão do plasmídeo com as mesmas enzimas de restrição utilizadas durante a clonagem (item 3.4.11) e analisadas por eletroforese em gel de agarose.

O plasmídeo recombinante pYESaoxAf [pYES2 contendo o gene *aoxAf*] foi selecionado para utilização nos experimentos de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*.

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

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

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

os quais foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos.

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

3.5.6 Indução da expressão do gene *aoxAf* em *S. cerevisiae*

Foram selecionadas colônias contendo plasmídeos com o gene *aoxAf* inserido em fase de leitura correta e sem nenhuma alteração de nucleotídeo. Estes plasmídeos foram utilizados para transformação em *S. cerevisiae*.

A transformação destas cepas foi realizada de acordo com o item 3.5.5.

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

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

Alíquotas de 1,5 mL de cultura foram coletadas no tempo zero, 3 h, 5 h, 8 h e 24 h. Essas alíquotas foram centrifugadas a 1.500g por 5 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspensão em 500 µL de água estéril e centrifugado novamente a 20.400g por 30 minutos. O precipitado foi congelado e ressuspensão em 500 µL de tampão de lise para levedura, centrifugado a 1.500g por 5 minutos a 4°C e em seguida as células foram ressuspensas em 100 µL do tampão de lise e adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro (0,4-0,6 µm). A lise das células foi processada por agitação em agitador mecânico por 30 segundos, seguida por resfriamento em gelo por 30 segundos. Esse processo

foi repetido por 4 vezes. A mistura foi centrifugada a 20.400g por 10 minutos a 4°C foram separados o precipitado e sobrenadante, os quais foram preparados para serem submetidos a eletroforese em SDS-PAGE.

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

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

Após a pré-incubação as células foram lavadas duas vezes com água destilada e uma vez com tampão de digestão, ressuspensas em tampão de digestão na proporção de 1,0 g para 2,0 mL de tampão e adicionados Liticase (Sigma-Aldrich) na proporção de 1 unidade por grama de células iniciais, além de DTT 2 mmol/L. A

digestão ocorreu sob agitação a 100 rpm por 45 minutos a 33°C. A formação de esferoplastos foi monitorada ao longo do tempo de digestão pela leitura da DO₆₀₀ de diluições das células em água destilada (1:200), a lise celular pela diluição em água é acompanhada por diminuição da densidade ótica.

Após a digestão as células foram centrifugadas a 9.000g por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão de digestão gelado. Em seguida foram adicionados as células 1,5 mL de tampão de lise 1 (gelado) por grama de células iniciais, além de 1,0 mmol/L PMSF e 1X PIC (Coquetel Inibidor de Protease-Sigma-Aldrich). As células foram lisadas em um sistema de lise manual tipo *Elvehjem-Potter* com 10 a 15 movimentos de fricção e então adicionados 1,5 mL de tampão de lise 2 (gelado) por grama de células iniciais. A mistura foi centrifugada a 2.000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 18.000g por 20 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi ressuspensionado gentilmente em 1,0 mL de tampão para ressuspensão mitocondrial (gelado) por grama de células iniciais e em seguida a mistura foi centrifugada a 2.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 18.000g

por 20 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi novamente ressuspensionado gentilmente em tampão para ressuspensão mitocondrial (gelado) no menor volume possível, em torno de 100 µL. A determinação da concentração de proteínas foi realizada de acordo com o item 3.5.12.

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

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

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

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

As amostras de proteínas preparadas como descrito no item 3.5.8. foram analisadas por SDS-PAGE aplicando-se no gel entre 15 e 20 µL de amostra. O gel de poliacrilamida-SDS foi produzido segundo LAEMMLI (1970). O gel de empilhamento foi preparado com concentração 5% em tampão Tris-HCl 1 mol/L (pH 6,8) e o gel de corrida 12% em Tris-HCl 1 mol/L (pH 8,8) (os reagentes e quantidades utilizadas no preparo de um gel, são descritos abaixo). A eletroforese se processou com amperagem constante de 10 mA por gel, durante 2,0 h, o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,3 e ao final da eletroforese o gel foi corado pela solução de *Coomassie Brilliant Blue G* e descorado por lavagens em solução descolorante.

Gel de empacotamento 5%

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

Gel de corrida 12%

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

3.5.10 Western Blot

As proteínas separadas eletroforeticamente foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo TOWBIN et al., (1979), através de um sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE e a membrana de nitrocelulose em um sistema “sanduíche” entre papéis de filtro protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética contendo tampão de transferência gelado e posicionado sobre um agitador magnético para a homogeneização do tampão; e aplicou-se uma corrente de 350 mA por 60 minutos.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram

incubadas com tampão TBS-T adicionado de 5% (p/v) de leite desnatado por 12 horas a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão TBS-T e incubadas na diluição 1:1.000 do anticorpo primário (monoclonal de camundongo) anti-oxidase alternativa de *Sauromatum guttatum* (gentilmente cedido pelo Dr. Lee McIntosh) (ELTHON et al., 1989) por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas por duas vezes, uma vez por 15 minutos e 3 vezes por 5 minutos com o mesmo tampão a uma razão de 4 mL de tampão por cm² de membrana.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (anti-anticorpo contra camundongo), na diluição apropriada (1:3.000), foi incubado com as membranas por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado da mesma maneira que anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação constantes no kit "*ECL Western blotting detection reagents and analysis system*" (Amersham Biosciences) foram misturadas, de modo que o volume final mantivesse uma razão de 0,125 mL/cm² de membrana. A marcação dos anticorpos primários foi visualizada em filme fotográfico.

3.5.11 Avaliação da taxa de crescimento das cepas de *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae/aoxAf*

A determinação da tolerância de *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae/aoxAf* aos desafios para crescimento em meio não-fermentativo e com inibidores da cadeia respiratória (KCN) foram realizados de acordo com DEMASI et al., 2001. As células foram cultivadas até uma concentração de 10^7 células por mL e então diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$. Quatro diluições seriadas de 1:10 foram realizadas e cada diluição semeada em meio de cultura SC não-fermentativo sólido e SC não-fermentativo contendo KCN 10 mmol/L. As placas foram incubadas por 2 dias e o crescimento das colônias observado.

3.5.12 Determinação da concentração de proteínas (método de Biureto)

Uma alíquota (20 μ L) da amostra a ser determinada foi misturada a 100 μ L de uma solução de ácido deoxicólico 5% (p/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reativo de biureto, composto por sulfato cúprico 0,15% (p/v),

tartarato de sódio e potássio 0,6% (p/v) e NaOH 0,75 mol/L. Após 10 minutos a absorvância foi determinada em 540 nm contra um branco de reagente e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições da amostra utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão protéico (CAIN & SKILLETER, 1987).

3.6 Medidas de consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio dos conídios de *A. fumigatus* e das células de *S. cerevisiae* foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo acoplado a um eletrodo tipo *Clark* (Gilson Medical Electronics), em volume final de 1,8 mL de meio de respiração para *A. fumigatus* e meio SC para *S. cerevisiae*. Os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com CHANCE & WILLIAMS (1956).

3.7 Avaliação da expressão e da atividade da oxidase alternativa na presença de radicais livres

Uma suspensão de 2×10^9 conídios de *A. fumigatus* foram inoculados em 50 mL de meio YG e incubados por 16 horas, à 30°C sob agitação de 150 rpm, na presença

ou menadiona 0,5 mmol/L ou de paraquat 5 mmol/L. Após este tempo, uma nova alíquota foi adicionada à cultura e incubada por mais uma hora. A suspensão de conídios foi centrifugada a 9.000g por 10 minutos e lavadas 3 vezes com tampão PBS. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente em eletrodo do tipo *Clark* em meio de respiração para *A. fumigatus*.

3.8 Interferência por RNA

3.8.1 Amplificação das sequências invertidas

As amplificações dos fragmentos de DNA a serem utilizados para a clonagem no vetor de indução de RNAi foram realizadas de acordo com SAIKI et al., (1985) e MEZEI & STORTS (1994), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Gradient Mastercycler Eppendorf).

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: primers utilizados na amplificação das sequências repetidas invertidas do gene *aoxAf* para clonagem em plasmídeo pALB1.

<i>primers RNAi</i>	
Forward	5'-GTTTACTATCCG GTTCGACCGCAAGCTT AGC-3' <i>Sal I</i> <i>Hind III</i>
Reverse	5'-GCAT GGGCCC TTTGTAGCTTCCT TCTAGA AAGAC-3' <i>Apa I</i> <i>Xba I</i>

Os sítios de restrição estão em negrito

3.8.2 Clonagem no vetor pALB1

Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, extraídos do gel e purificados por meio de filtração em colunas centrifugáveis com membranas de 0,45 µm (Durapore[®]-Millipore), precipitados e ressuspensão em água deionizada estéril.

Estes fragmentos, juntamente com o plasmídeo pALB1 (gentilmente cedido pela Dra. Isabelle Mouyna, Instituto Pasteur) foram submetidos à digestão com enzimas de restrição apropriadas (MOUYNA et al., 2004). Após a purificação, realizou-se a ligação dos fragmentos no plasmídeo pALB1.

Figura 4: Construção utilizada na RNAi. A construção foi realizada clonando sequências de 500 pb repetidas invertidas do gene *aoxAf*. O vetor utiliza o promotor do gene da glucoamilase de *A. niger* (pGla), o terminador do gene *alb1* (*pksp*) e sequências do próprio gene *alb1* como marcador para a transformação.

A clonagem foi realizada conforme descrito por MEZEI & STORTS (1994). Os fragmentos de DNA de 500 pb foram clonados em orientações invertidas para a produção de um RNA mensageiro dupla fita (Figura 4).

3.8.3 Produção de esferoplastos de *A. fumigatus*

Esferoplastos de *A. fumigatus*, cepa CEA17 (*pyrG*), foram produzidos de acordo com TILBURN et al. (1983) com modificações.

Cerca de 1×10^7 conídios foram inoculados em 50 mL de meio YG líquido e incubados por 16 horas a 30°C sob agitação constante de 200 rpm. Após este período, os conídios, já com tubo germinativo, foram coletados por centrifugação a 2.000g por 5 minutos e ressuspensos em 20 mL de Solução 1 e 6,5 mL de solução de $MgSO_4$ 1

mol/L. Separadamente, 400 mg de BSA e 300 mg de Glucanex (Novo Nordisk) foram solubilizadas em 20 mL de Solução 2 e esta nova solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,45 μm . Em seguida, esta solução estéril foi adicionada à suspensão de conídios. Os conídios foram incubados por 5 horas a 30°C sob agitação constante de 70 rpm. Após este período, os esferoplastos foram recuperados por filtração em seringa contendo lã de vidro estéril. A suspensão de esferoplastos foi centrifugada a 3.000g por 10 minutos e as células foram lavadas 2 vezes com Solução 3 gelada. Os esferoplastos recuperados foram utilizados para transformações.

3.8.4 Transformação de *A. fumigatus*

A transformação foi realizada de acordo com o método descrito por TILBURN et al. (1983) com modificações.

Os esferoplastos foram ressuspensos em 1 mL de Solução 5 e incubados no gelo por 10 minutos. Após este período, cerca de 100 μL da suspensão de células foram adicionados de 4-20 μg de DNA (DNA ressuspenso em no máximo 20 μL) e misturados gentilmente. Cerca de

50 μ L de Solução 4 foram adicionados à suspensão de esferoplastos e a mistura foi incubada no gelo por 10 minutos. Após este período, 1 mL da mesma Solução 4 foi adicionado e homogeneizado na suspensão, que foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Toda a suspensão foi diluída em 30 mL de meio mínimo TOP ÁGAR [ágar 1% (p/v)] contendo sacarose 1 mol/L e higromicina 200 μ g/mL. Os 30 mL da suspensão de conídios diluída foram distribuídos sobre 3 placas de Petri contendo meio mínimo [ágar 2% (p/v)] adicionado de sacarose 1 mol/L e higromicina 200 μ g/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 4 a 5 dias para se verificar o crescimento dos clones transformados.

3.8.5 Seleção dos clones positivos para a RNAi

A seleção dos clones positivos para a RNAi foi realizada através da indução do silenciamento do gene *reporter* (*alb1*) com diferentes fontes de carbono no meio de cultura (MOUYNA et al., 2004).

Os clones foram semeados pontualmente e separadamente em placas de Petri contendo meio mínimo com xilose (repressor) ou maltose (indutor) 2% (p/v)

como fonte de carbono e higromicina (200 µg/mL). Após incubação a 30°C por 4 a 5 dias, as colônias brancas ou verde claras crescidas em meio mínimo contendo maltose e verde escuras crescidas no mesmo meio contendo xilose foram consideradas positivas para a transformação e para a RNAi.

3.9 Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT-PCR")

A extração de RNA foi realizada de acordo com o item 3.4.13 e a síntese da fita de cDNA de acordo com o item 3.4.14.

A quantificação do nível de expressão do gene *aoxAf* foi realizada em um aparelho de PCR em tempo real ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem) e Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) utilizando primers LUX (Invitrogen).

Os primers utilizados foram desenhados utilizando o programa *D-LUX® Designer Software* (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11263>) e estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: *primers* utilizados em experimentos de Real Time - PCR

<i>PRIMERS aoxAf</i>	
Forward	5'-GTTTACTATCCGGTCGACCGCAAGCTTAGCGGC-3'
Reverse	5'-CATGGGCCCTTTGTATGCTTCCTCTAGAAGAGTT [FAM] G-3'
<i>PRIMERS β-tubulina</i>	
Forward	5'-GTCGTACAGAGCCTCGTTGTCG-3'
Reverse	5'-CGAGCCCTCTCCGTTCCACCAGCT [FAM] G-3'

FAM - 6-carboxifluoresceína

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

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

Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para os dois pares de *primers* com diferentes concentrações de DNA genômico. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas de calibração foi determinada através de duas considerações: *A. fumigatus* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma. Além disto, considerando que o tamanho do genoma do *A. fumigatus* é igual a 29,4 Mb (NIERMAN et al., 2005), um genoma corresponde a aproximadamente 30 fg (10^{-15} gramas). Portanto, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. fumigatus* correspondem a uma cópia de cada um dos genes do fungo.

Desta forma, foram realizadas reações com diferentes diluições (Tabela 5) do DNA genômico do fungo e por meio de regressão linear foi determinada a equação da reta correspondente à curva de calibração para cada par de *primers*.

Tabela 5: Diluições do DNA genômico para a construção de uma curva de calibração dos *primers*

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

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

3.10 Determinação da produção de ERO em conídios de *A. fumigatus*.

A determinação da formação de espécies ERO em células fúngicas foi realizada utilizando a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (Invitrogen), conforme descrito por RUY et al., (2006) com algumas modificações. Conídios (5×10^6 UFC/mL) de *A. fumigatus*

provenientes das cepas CEA17 (*pyrG*) (CEA-controle), pALB1 (cepa com interferência para o gene *alb1*) e pALB1/*aoxAf* (cepa com dupla interferência para o gene *alb1/aoxAf*) foram incubadas por 30 min a 37°C em meio de respiração para *A. fumigatus* na presença da sonda fluorescente CM-H₂DCFDA 5 µmol/L (Invitrogen).

A determinação da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro *Hitachi-F4500* a 30°C com comprimentos de onda de excitação de 503 nm e emissão 529 nm.

3.11 Determinação da viabilidade de conídios de *A. fumigatus* através de citometria de fluxo.

Os conídios de *A. fumigatus* das cepas CEA, pALB1 e pALB1/*aoxAf* foram cultivados por 48 horas em meio sólido a 30°C.

Cerca de 5×10^6 conídios de cada cepa foram incubados em meio mínimo contendo maltose, adicionados de antimicina A 25 µmol/L, e incubados por 1 hora a 30°C, sob agitação. Após este período, foram adicionados diferentes pró-oxidantes como menadiona 5,0 mmol/L, paraquat 50 mmol/L ou H₂O₂ 80 mmol/L e incubou-se por 5 horas, nas mesmas condições. Em

seguida, os conídios foram centrifugados a 20.400g por 10 minutos e lavados 2 vezes com tampão PBS 1X.

Os conídios foram ressuspensos em 200 µL de solução GH (Glicose-Hepes) contendo 5 µM da sonda FUN[®] 1 (Molecular probes) e incubados no escuro por 30 minutos a 37°C, sob agitação. A adição de Iodeto de Propídio (PI) 0,5 µM foi realizada no momento da leitura.

As células foram analisadas em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD), no qual foram adquiridos 30.000 eventos para cada análise realizada. Inicialmente, para cada uma das cepas foram determinadas as características como volume (*Forward Scatter* ou *FSC*) e complexidade interna das células (*Side Scatter* ou *SSC*).

3.12 Killing por macrófagos

O ensaio de *killing* de conídios por macrófagos foi adaptado de PECK, 1995. Os macrófagos utilizados foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos *C57 Black 6*.

Cerca de 4×10^5 células foram incubadas em cada poço de uma placa de 96 poços, em meio RPMI completo, por 12 horas a 37°C em estufa de 5% CO₂. Após este

período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionadas suspensões de conídios (4×10^6 células por poço). A mistura de células foi incubada por 30 minutos, 2, 4 e 8 horas, sendo que ao final de cada tempo as placas foram centrifugadas a 2.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μ L de solução contendo Triton X-100 1% (p/v). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 2.000g por 10 minutos. O sedimento foi lavado por duas vezes com 100 μ L de água deionizada estéril e posteriormente, ressuspenso em 100 μ L de meio RPMI sem o vermelho fenol, contendo MTT 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich). As placas foram protegidas da luz e incubadas a 37°C por 2 horas. Após este período, o sedimento foi recuperado com centrifugação a 2.000g por 10 minutos. As placas foram invertidas sobre papel de filtro para se eliminar o excesso de MTT e posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de isopropanol e incubado à temperatura ambiente por pelo menos 12 horas com proteção da luz. Após este período, as placas foram submetidas à leitura em comprimento de onda de 570 nm. Como branco foi

utilizado isopropanol, como controle negativo foram utilizados apenas os macrófagos e como controle positivo, apenas os conídios.

Para cada tempo analisado foram realizadas reações em triplicata.

A porcentagem de atividade microbicida foi avaliada pela fórmula abaixo:

$$\% = 1 - [\text{DO da amostra} / \text{DO controle positivo}] \times 100$$

3.13 Análises estatísticas

As análises dos resultados da avaliação da expressão e da atividade da oxidase alternativa na presença de radicais livres foram expressas como a média dos valores $\pm$ SEM (Desvio padrão da média). A análise estatística foi realizada pelo programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software Corporation, versão 4.00, 2003) utilizando o *Student's t test*.

Para a determinação da viabilidade de conídios pela técnica de citometria de fluxo e a comparação entre os valores de porcentagem de fagocitose ou número médio de conídios em cada macrófago, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de *Newman Keuls*, pelo programa *GraphPad*

Prism (GraphPad Software Corporation, versão 4.00, 2003).

Foram considerados estatisticamente significativos aqueles resultados com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Cultivo de *A. fumigatus*

A cepa de *A. fumigatus* foi mensalmente semeada em meio YG sólido e incubada a 37°C durante 48 horas. Após este período de crescimento, foi mantida a 4°C.

4.2 Extração e isolamento do DNA de *A. fumigatus*

O DNA isolado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose, a qual evidenciou uma única banda sem arrastes, indicando a integridade do DNA (Figura 05). A pureza do DNA foi determinada a partir da relação entre as absorvâncias em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, obtendo um valor entre 1,8-2,0.

Figura 05: Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE, do DNA extraído de *A. fumigatus*.

1: Marcador de peso molecular λ HindIII (Invitrogen)

2: DNA isolado de *Aspergillus fumigatus*

4.3 Construção da biblioteca genômica parcial de *A. fumigatus*

O DNA genômico foi totalmente digerido com diferentes enzimas de restrição (*Xba*I, *Bam*HI, *Pst*I, *Eco*RI, *Xho*I e *Xho*I/*Eco*RI) para a construção de uma biblioteca parcial de DNA.

Após a transferência do DNA digerido para a membrana de nylon, foi realizada a hibridação da membrana com o fragmento de 450 pb (Figura 03) marcado radioativamente com ^{32}P , sob condições de elevada estrringência.

A figura 06 corresponde a um filme radiográfico exposto à membrana de nylon radiomarcada com a sonda, em que podem ser observados diferentes padrões de marcação entre as amostras.

Figura 06: Filme radiográfico exposto à membrana de nylon hibridada com a sonda, do DNA digerido com as seguintes enzimas de restrição:

1: <i>Xba</i> I	5: <i>Hind</i> III
2: <i>Bam</i> HI	6: <i>Eco</i> RI
3: <i>Pst</i> I	7: <i>Xho</i> I e <i>Eco</i> RI
4: <i>Xho</i> I	

Os fragmentos radiomarcados foram selecionados para a construção de uma biblioteca genômica parcial. Após o isolamento e purificação dos fragmentos, realizou-se a clonagem em plasmídeo pBSII-KS⁺,

previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

Após a clonagem e transformação de células competentes *E. coli* (DH5 α), foram obtidos vários clones positivos, que foram transferidos para uma membrana de nylon e hibridados com a sonda genética. O padrão de marcação foi positivo para 25 clones, os quais foram isolados e purificados por duas vezes através de marcação com a sonda. Quatro clones foram escolhidos aleatoriamente, para realização do sequenciamento.

4.4 Análise do sequenciamento dos clones positivos

Após o sequenciamento através da técnica de *primer walking*, as sequências dos clones positivos foram analisadas contra um banco de dados de proteínas (BLASTx, ALTSCHUL et. al., 1997) que revelou uma similaridade com oxidases alternativa descritas em outras espécies (Figura 07).

BLASTX 2.2.11

RID: 1117629254-10173-148251538271.BLASTQ4

Query = (1173 letters)

		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
<u>ref XP_001260128.1 </u>	alternative oxidase AlxA, putative [Neosa...	<u>667</u>	0.0
<u>ref XP_001272693.1 </u>	alternative oxidase AlxA, putative [Asper...	<u>600</u>	7e-170
<u>ref XP_001819511.1 </u>	[Aspergillus oryzae] >dbj BAE57509.1 unn...	<u>581</u>	3e-164
<u>sp O74180 AOX_ASPNG</u>	Alternative oxidase, mitochondrial precur...	<u>579</u>	1e-163
<u>ref XP_001394472.1 </u>	alternative oxidase aox1-Aspergillus nige...	<u>577</u>	6e-163
<u>ref XP_001215177.1 </u>	alternative oxidase, mitochondrial precur...	<u>569</u>	1e-160
<u>sp Q9P959 AOX_EMENI</u>	Alternative oxidase, mitochondrial precursor	<u>560</u>	8e-158

Figura 07: Análise da sequência pelo programa Blastx, dos clones enviados para sequenciamento.

A obtenção da sequência de DNA genômico possibilitou a posterior amplificação da sequência de cDNA, a qual foi clonada e sequenciada.

A sequência do DNA genômico apresentou 1.173 nucleotídeos, que foram sequenciados a partir do *start* códon (ATG) na posição 1 até o *stop* códon (TGA) na posição 1.173. O alinhamento das sequências de cDNA e DNA genômico revelou a presença de dois íntrons, com 54 e 60 nucleotídeos cada um. A proteína deduzida apresenta um ponto isoelétrico estimado de 9,51 e peso molecular teórico de aproximadamente 40,84 kDa, calculados pelo programa *Compute pI/Mw* do *Expert Protein Analysis System* (<http://us.expasy.org>).

A sequência nucleotídica do gene e a deduzida de aminoácidos estão representadas na figura 08.

M N S I T A T M P L R A T A F P K P Y L
 1 atgaactcgataacagcaaccatgcccttgcggtactgcattcccaaaccatatctc 60
 R F T I R T Y A S A A A A P R C S R P L
 61 cggtttactatccggacctacgcaagcgcagcggctgcaccacgatgcagtcggcccctg 120
 L A S S S H F Q S F T K R P I S S T P Q
 121 ctagcaagcagtagccactttcagtcatttacaaaacggcccatctcgtcaacaccgcag 180
 T Q I K E Y F P P P K A P H I K E V E T
 181 acacaaatcaaagaataactttcctccgccgaaggctcctcacatcaaggaggttgagacg 240

 A W V H P I Y **Intron I**
 241 gcctgggttcacccctatttac**gtatccttttggttgatatctacttttgacatgctcccg** 300
 T E D Q M R A V Q I A H R E A
 301 **gctgacaattttag**accgaagaccagatgcgcgtgttcagatagcccaccgagaagcc 360
 K N W S D W V A L G T V R V L R W G M D
 361 aagaactgggtccgactgggtggcgctcgggacagtcaggatgctcagatggggtatggac 420
 F V T G Y R H P K P G Q E H D A K F R M
 421 ttctgtgaccgggtaccgacacccccaaagccgggccaggaacacgacgccaattcagaatg 480
 T E Q K W L T R F I F L E S V A G V P G
 481 accgagcagaagtggcttactcgatttatcttctcgagagcgtggctggcgtgccaggc 540

 M V G G M L R H L R S L R R M K R D N G
 541 atggttgaggaggatgctgaggcatctgcggagcttgagacgaatgaagagggacaacgga 600

 W **Intron II**
 601 tgg**gtagttctcggttttggtaatcgagcttcccgagttcacgttggtgctaacaatagc** 660
 I E T L L E E A Y N E R M H L L T F L
 661 **cagattgaaactcttcttgaggaggcatacaatgagcgcagtcatttgcttaccttctc** 720
 K L A E P G W F M R L M V L G A Q G V F
 721 aagcttgctgagccaggatgggttcagtcgactcatggttctcggagcccaaggcgtcttc 780
 F N G F F L S Y L I S P R T C H R F V G
 781 ttcaatgggttcttcttcttcatacctgatttccccacgcacctgccaccgggttcgttggc 840
 Y L E E E A V I T Y T R A I K D I E T G
 841 taccttgaagaagaagccgtcatcacctacactcgggccatcaaagatattgagacagga 900
 K L P D W E K L D A P E I A V Q Y W N M
 901 aagctgcccgaattgggagaagttggatgctcccagatcgccgtccagtagtgaatatg 960
 P E G Q R K M R D L L Q Y V R A D E A K
 961 cccgaggggcagcgcgaagatgagagacttattgcagtacgtgcgggctgacgaggcaag1020

 H R E V N H T L G G N L Q H N V D P N P Y
 1021 caccgcgaggtcaaccacacactgggaaaccttcaacacaatgtggatccgaacccgtac1080

 A A K Y K D P S K P H P T K G I E N L K
 1081 gcagccaagtacaaggacccctccaagcctcatccgacaaagggcattgagaatttgaag1140
 S P G W E R E E V I *
 1141 tcgcccggatgggagagagaagaggtgatttga 1173

Figura 08: Sequência nucleotídica do gene da oxidase alternativa de *A. fumigatus* com a dedução dos aminoácidos codificados e representação dos introns em negrito. A sequência dos *primers* utilizados para amplificação da sonda estão sublinhados.

4.5 Análise molecular da oxidase alternativa de *Aspergillus fumigatus*

O alinhamento, realizado pelo programa *CLUSTAL W*, da sequência de aminoácidos da proteína de *A. fumigatus* com outras já descritas, revelou uma elevada identidade com oxidases alternativa de outros fungos como, por exemplo, *A. niger* (78%) (KIRIMURA et al., 1999), *P. anserina* (51%) (LORIN et al., 2001) e *N. crassa* (50%) (LI et al., 1996) e uma menor identidade com plantas, como *Arabidopsis thaliana* (29%) (SAISHO et al., 1997) e parasitas, *T. brucei brucei*. (36%) (CHAUDHURI et al., 1996).

Foram identificados na sequência os domínios altamente conservados LET, NERMHL, LEEA e RADE-H, resíduos de histidina, glutamato e dois resíduos de tirosina (Figura 09). O modelo estrutural desta proteína é baseado em hipóteses que sugerem a presença de quatro hélices, que se organizam duas a duas em orientações anti-paralelas.

<i>A. fumigatus</i>	MNSITAT-----MPLRATAFPKPYLRFTTIRTYASAAAAP--RCSRPLLA
<i>A. niger</i>	MNSLTAT-----APIRA-AIPKSYMHIATRNYSGVIAMSGLRCSGSLVA
<i>A. nidulans</i>	MNSMSTT-----GPIRGGAIPKHLYLQFTVRTYTRSMASAGLRYSNPPLV
<i>N. crassa</i>	MNTPKVN----ILHAPGQAAQLSRALISTCH-TRPLLLAGS--RVATSLHP
<i>P. anserina</i>	MISSKTSNRICLCSPQQTARITGIVVS----SRPAYLTGLGYPVSLRLSS
<i>C. albicans</i>	MLTASLY-----KQLPVLTTTATSTYSFIRLSSTLATPPHSTTTTSPS
	* : . . . :

<i>A. fumigatus</i>	SSSHFQSFTKRPIST--S--PQTQIKEYFPPPK-----APHIKEVETAWV..P
<i>A. niger</i>	N--RHQTAGKRFIS--TT--PKSQIKEFFPPPT-----APHVKEVETAWVH?
<i>A. nidulans</i>	KKCYDQPTGKRFIS--ST--PQSQIKDYFPPPD-----APKIVEVKTAWAH?
<i>N. crassa</i>	TQTNLSSPSPRNFS--TT--SVTRLKDFFPAKE-----TAYIRQTTPAWPH?
<i>P. anserina</i>	AVSQSSSQHTRSFS--ST--RAAHLKDFFPVKE-----TAYIRKTTPAWPH?
<i>C. albicans</i>	SPAFHQPNHPQQFANPNT--SVFDVSTRIYTQEGIDNNNDTKFLTAPYPH?
	.. : :: .* .. :

<i>A. fumigatus</i>	IYTEDQMRAVDIAHREAKNWS--D--NVALGTVRVIRWGMDFVTGYRHPK----
<i>A. niger</i>	VYTEEQMKQVAIAHRDAKNWAD--D--NVALGTVRMIRWGM--DLVTGYRHPP----
<i>A. nidulans</i>	VYSEEEMRAVTVGHREAKNWS--D--NVALGSVRLIRWGM--DLVTGYKHPA----
<i>N. crassa</i>	GWTEEEMTSVVP--EHRKPE--TVCD--NLAWKLVRICRWATDIATGIRPEQQVDK
<i>P. anserina</i>	GYTEEEMLAVVP--QHRKPGSLSD--NLAWKLVRICRWATDIATGIKPEQQVDK
<i>C. albicans</i>	VFPQDECENVTVTHRETKTLED--KISFRSIQFM--RQCD--DLVTGYAVPKTN--
	: .::: * **.. . * :: : : * * : **

Hélice

<i>A. fumigatus</i>	--PGQEHDAKFRMT--EQWLT--R--FIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
<i>A. niger</i>	--PGREHEARFKMT--EQWLT--R--FIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
<i>A. nidulans</i>	--PGQEDIKKFQMT--EKWLT--R--FIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
<i>N. crassa</i>	HPPTATSADKPLTEA--QWLT--R--FIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
<i>P. anserina</i>	SNPTTAVAAQKPLTEA--QWLT--R--FIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
<i>C. albicans</i>	--N--PDEFKGT--RWEMTEGK--WLT--R--CIFLESVAGVPGV--GGLRHL--RSLRRMKR
	* : ** : ** * : ***** : * : ***** *** : *

Hélice

<i>A. fumigatus</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMP--SMVLGA--QGVFF--NGFFLS
<i>A. niger</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMR--MLMVLGA--QGVFF--NGFFLS
<i>A. nidulans</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMR--MLMVLGA--QGVFF--NGFFLS
<i>N. crassa</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMR--MLMVLGA--QGVFF--NGFFLS
<i>P. anserina</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMR--MLMVLGA--QGVFF--NGFFLS
<i>C. albicans</i>	D--NCWIETLLEEAYNERMH--LTF--LKLAEP--GWFMR--MLMVLGA--QGVFF--NGFFLS
	* . ***** : * : ***** : * : * : : : * : ***** : *

Hélice

<i>A. fumigatus</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--TRAIKDIET--G--KL--PDW--EKLDAP--EIA
<i>A. niger</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--TRAIKEIEA--G--SL--PAW--EKTEAP--EIA
<i>A. nidulans</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--TRAIKDLES--G--RL--PHW--EKLEAP--EIA
<i>N. crassa</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--TRAICIREIEE--G--RL--PKWSDEKFEI--PEMA
<i>P. anserina</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--TRAICIREIEE--G--RL--PKWSDPNFQI--PDLA
<i>C. albicans</i>	YL--SPR--TCHRE--FGYIEE--EAVITY--SHLLDELAVPG--KL--PAF--ETMKI--PEVA
	** . * : *** ***** ** : : : : * ** : . . * : *

Hélice

<i>A. fumigatus</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
<i>A. niger</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
<i>A. nidulans</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
<i>N. crassa</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
<i>P. anserina</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
<i>C. albicans</i>	V--DYW--NMPEGQ--RKMRD--LLYVRADEA--H--REVNHT--LGN--LQHNVD--PNPYAAKY
	* ** : .::: * : ***** * : ***** : * : * : *

<i>A. fumigatus</i>	K-DPSKRHP TKGIENLKSTG <u>VE</u> REEVI-
<i>A. niger</i>	K-DPTKAHP NKG IADLKPTG <u>VE</u> REEVI-
<i>A. nidulans</i>	K-DPSKPHP SKGIKHLKTG <u>VE</u> REEVV-
<i>N. crassa</i>	KEGEGGRRP /N--PALKPTG <u>TE</u> RAEVIG
<i>P. anserina</i>	KCDADHQRP -N--PALKPTG <u>TE</u> RSEVIG
<i>C. albicans</i>	E-GLNKPQP NHGINVMRPTG <u>VE</u> KQDLQL
	: . : : : . : : ::

Figura 09: Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de oxidases alternativa de diferentes fungos. Em preto estão destacados os aminoácidos conservados entre as espécies; estão sublinhados em vermelho os quatro domínios conservados; resíduos de histidina e glutamato estão circuladas e os resíduos de tirosina estão indicados por losangos (◊).

Análises de hidropaticidade foram realizadas baseado no algoritmo de Kyte-Doolittle, utilizando programa GREASE (KYTE & DOOLITTLE, 1982). A sequência deduzida de aminoácido da AOXAf apresentou um perfil muito similar às sequências de outros fungos, com a presença de duas regiões hidrofóbicas (Figura 10).

Figura 10: Comparação entre os perfis de hidropaticidade entre sequências deduzidas de aminoácidos de oxidases alternativa dos seguintes fungos:

I: *A. fumigatus* III: *N. crassa*

II: *A. niger* IV: *P. anserina*

1 e 2 representam regiões conservadas com caráter hidrofóbico.

4.6 Comparação entre as oxidases alternativa de fungos e plantas

A figura 11 representa o alinhamento entre as sequências de proteínas de oxidases alternativa de fungos, plantas e parasita, realizado pelo programa

MAP program analysis (HUANG, 1994), que permite a introdução de gaps na sequência. Esta análise revelou uma divergência considerável na porção N-terminal das sequências e a presença de dois resíduos de cisteína (Cys-122 e Cys-172, número dos resíduos em *S. guttatum*) altamente conservados nas sequências de plantas e ausentes em fungos e em parasitas como *T. brucei*. Uma maior homologia foi verificada na porção C-terminal, com a presença dos quatro domínios regulatórios (LET, NERMHL, LEEA e RADE--H) conservados em todas as sequências.

<i>S. guttatum</i>	MMSSRLVGTA	LCRQLSHVPV	PQYLPALRPT	AD-----TAS	SLLHGCSAAA
<i>G. max</i>	-MMSRSGGNR	VANTAMFVA-	-----	-----	---KGLSGEV
<i>A. thaliana</i>	-MITR-GGAK	AAKSLVAAG	PRLFSTVRTV	SSHEALSASH	ILKPGVTSAW
<i>T. brucei</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>N. crassa</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>P. anserina</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C. albicans</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. niger</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. fumigatus</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>S. guttatum</i>	PAQRAGLWPP	SWFSPPRHAS	TLSAPAQDGG	KEKAAG----	---TAGKVPP
<i>G. max</i>	GGLRA-----	LYGGGVRSSE	TLALSEKEKI	EKK-----	----VGLSSA
<i>A. thaliana</i>	IWTRA-----	PTIGGMRFAS	TITLGEKTPM	KEEDANQKKT	ENESTGGDAA
<i>T. brucei</i>	-----	-----	-----	-----	-----M
<i>N. crassa</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>P. anserina</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C. albicans</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. niger</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. fumigatus</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>S. guttatum</i>	GEDGGAEKEA	VVSYWAVPPS	KVSKEDGSEW	RWT-----	-----
<i>G. max</i>	GGN-KEEK-V	IVSYWGIQPS	KITKKGTEW	KWN-----	-----
<i>A. thaliana</i>	GGNNKGDK-G	IASYWGVEPN	KITKEDGSEW	KWN-----	-----
<i>T. brucei</i>	FRNHASRITA	AAAPWVLRTA	CRQKSDAKTP	VWGHTQLNRL	SFLETVPVVP
<i>N. crassa</i>	-----	-----	-----	-----	-----MNT
<i>P. anserina</i>	-----	-----	-----	-----	-----MIS
<i>C. albicans</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. niger</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. fumigatus</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>S. guttatum</i>	-----	-----	-----	-----	-----

<i>G. max</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>T. brucei</i>	LRVSEDESSED	RPT-----	-----	-----	-----
<i>N. crassa</i>	PKVN---ILH	APGQAAQLSR	ALIS-TCHTR	PLLLAGSRVA	TSLHPTQ--T
<i>P. anserina</i>	SKTSNRICLC	SPQQTARITG	IVVS----SR	PAYLTGLGYP	VSLRLSSAVS
<i>C. albicans</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. niger</i>	---MNSLTAT	APIRA-AIPK	SYMHIATRNY	SGVIAMSGLR	CSGSLVAN--
<i>A. fumigatus</i>	---MNSITAT	MPLRATAFPK	PYLRFRTIRTY	ASAAAAAP--R	CSRPLLASSS

<i>S. guttatum</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>G. max</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>T. brucei</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>N. crassa</i>	NLSSSPSPRNF	STTSVTRLKD	FFPAKETAYI	RQ-----	-----
<i>P. anserina</i>	QSSSQHTRSF	SSTRAAHLKD	FFPVKETAYI	RK-----	-----
<i>C. albicans</i>	-----	-----	-----	--MIGLSTYR	NLPTLLTTTT
<i>A. niger</i>	RHQTAGKRFI	STTPKSQIKE	FFPPPTAPHV	KE-----	-----
<i>A. fumigatus</i>	HFQSFTKRPI	SSTPQTQIKE	YFPPPKAPHI	KE-----	-----

<i>S. guttatum</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>G. max</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>T. brucei</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>N. crassa</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>P. anserina</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C. albicans</i>	VISTALRSKQ	LLRFTTTTST	KSRSSSTSTAA	TTVGNSNPKS	PIDEDNLEKP
<i>A. niger</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. fumigatus</i>	-----	-----	-----	-----	-----

122

<i>S. guttatum</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>G. max</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>T. brucei</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>N. crassa</i>	-----	-----	-----	-TPPAWPHHG	WTEEEMTSVV
<i>P. anserina</i>	-----	-----	-----	-TPPAWPHHG	YTEEEMLAVV
<i>C. albicans</i>	GTIPTKHKPF	NIQTEVYNKA	GIEANDDDKF	LTKPTYRHED	FTEAGVYRVH
<i>A. niger</i>	-----	-----	-----	-VETAWVHPV	YTEEQMKQVA
<i>A. fumigatus</i>	-----	-----	-----	-VETAWVHPI	YTEDQMRVQ

<i>S. guttatum</i>	HKHHVPTTIL	DKLALRTVKA	LRWPTDIFF-	-----	-----
<i>G. max</i>	EKHMPPPTFL	DKMAFWTVKV	LRYPDVF--	-----	-----
<i>A. thaliana</i>	KKHHVPTTFL	DRIAYWTVKS	LRWPTDLFF-	-----	-----
<i>T. brucei</i>	ITHKKPNGLV	DTLAYRSVRT	CRWLFDTFSL	YRFGS-----	-----
<i>N. crassa</i>	PEHRKPETVG	DWLAWKLVRI	CRWATDIATG	IRPEQQVDKH	HPTTATSADK
<i>P. anserina</i>	PQHRKPGSLS	DWLAWKLVRL	CRWGTDIATG	IKPEQQVDKS	NPTTAVAAQK
<i>C. albicans</i>	VTHRPPRTIG	DKISCYGTLE	FRKCFDLVTG	YAVP---DPD	KPDQYKGTRW
<i>A. niger</i>	IAHRDAKNWA	DWVALGTVRM	LRWGMDLVTG	YR-----HP	PPGREHEARF
<i>A. fumigatus</i>	IAHREAKNWS	DWVALGTVRV	LRWGMDFVTG	YR-----HP	KPGQEHDAKF

172

<i>S. guttatum</i>	---QRRYACR	AMMLETVA	AV	PGMVGGVLLH	LKSLRRFEHS	GGWIRALEEE
<i>G. max</i>	---QRRYQCR	AMMLETVA	AV	PGMVAGMQLH	CKSLRRFEHS	GGWFKALLEE
<i>A. thaliana</i>	---QRRYQCR	AMMLETVA	AV	PGMVGGMLLH	CKSLRRFEQS	GGWIKALLEE
<i>T. brucei</i>	-ITESKVISR	CLFLETVAGV		PGMVGGMLRH	LSSLRYMTRD	KGWINTLLVE
<i>N. crassa</i>	PLTEAQWLVR	FIFLESIA	GV	PGMVAGMLRH	LHSLRRLKRD	NGWIETLLEE
<i>P. anserina</i>	PLTEAQWLVR	FIFLESIA	GV	PGMVAGMLRH	LESRLRLKRD	NGWIETLLEE
<i>C. albicans</i>	EMTEEKWMTR	CIFLESIA	GV	PGSVAGFVRH	LHSLRMLTRD	KAWIETLHDE
<i>A. niger</i>	KMTEQKWLTR	FIFLESVAGV		PGMVGGMLRH	LRLSLRRMKRD	NGWIETLLEE
<i>A. fumigatus</i>	RMTEQKWLTR	FIFLESVAGV		PGMVGGMLRH	LRLSLRRMKRD	NGWIETLLEE

<i>S. guttatum</i>	AENERMHLMT	FMEVAQPRWY	ERALVLAVQG	VFFNAYFLGY	LLSPKFAHRV
<i>G. max</i>	AENERMHLMT	FMEVAKPKWY	ERALVITVQG	VFFNAYFLGY	LLSPKFAHRM
<i>A. thaliana</i>	AENERMHLMT	FMEVAKPKWY	ERALVITVQG	VFFNAYFLGY	LISPKFAHRM
<i>T. brucei</i>	AENERMHLMT	FIELRQPGLP	LRVSIITQA	IMYLFLLVAY	VISPRFVHRF
<i>N. crassa</i>	SYNERMHLLT	FMKMCEPGLL	MKTLILGAQG	VFFNAMFLSY	LISPKITHRF
<i>P. anserina</i>	SYNERMHLLT	FMKMCEPGWF	MKTMILGAQG	VFFNAMFLSY	LISPRITHRF
<i>C. albicans</i>	AYNERMHLLT	FIKIGKPSWF	TRSIIYIGQG	VFTNIFFLVY	LMNPRYCHRF
<i>A. niger</i>	AYNERMHLLT	FLKLAEPGWF	MRLMVLGAQG	VFFNGFFLSY	LMSPRICHRF
<i>A. fumigatus</i>	<u>AYNERMHLLT</u>	FLKLAEPGWF	MRLMVLGAQG	VFFNGFFLSY	LISPRTCHRF
<i>S. guttatum</i>	VGYLEEEAIIH	SYTEFLKDD	SGAI-----	QDCPAPAIAL	DYWRLPQGS-
<i>G. max</i>	VGYLEEEAIIH	SYTEFLKELD	KGNI-----	ENVPAPAIAI	DYWQLPPGS-
<i>A. thaliana</i>	VGYLEEEAIIH	SYTEFLKELD	KGNI-----	ENVPAPAIAI	DYWRLPADA-
<i>T. brucei</i>	VGYLEEEAVI	TYTGVMRAD	EGRLRPT---	-KNDVPEVAR	VYWNLSKNA-
<i>N. crassa</i>	VGYLEEEAVH	TYTRCIREIE	E-GHLPKWS	EKFEIPEMAV	RYWRMPEGKR
<i>P. anserina</i>	VGYLEEEAVH	TYTRCIREIE	Q-GDLPKWS	PNFQIPDLAV	TYWKMPEGKR
<i>C. albicans</i>	VGYLEEEAVR	TYTHLIDELD	DPNKLPDF--	QKLPIPNIAV	QYWPELTPE
<i>A. niger</i>	VGYLEEEAVI	TYTRAIKEIE	A-GSLPAW--	EKTEAPEIAV	QYWKMEGQR
<i>A. fumigatus</i>	<u>VGYLEEEAVI</u>	TYTRAIKDIE	T-GKLPDW--	EKLDAPEIAV	QYWNMEGQR
<i>S. guttatum</i>	TLRDVVTVVR	ADEAHHRDVN	HFASDVHYQD	LELKTTPAPL	GYH-----
<i>G. max</i>	TLRDVVMVVR	ADEAHHRDVN	HFASDIHYQG	RELREAAPI	GYH-----
<i>A. thaliana</i>	TLRDVVMVVR	ADEAHHRDVN	HFASDIHYQG	RELKEAPAPI	GYH-----
<i>T. brucei</i>	TFRDLINVIR	ADEAEHRVNV	HTFADMHEKR	LQNSVNPFFV	-LKKNPPEMY
<i>N. crassa</i>	TMKDLIHYIR	ADEAVHRGVN	HTLSNLDQKE	---DPNPFVS	DYKEGEGGRR
<i>P. anserina</i>	TMRDLILYIR	ADEAVHRGVN	HTLSNLNHKE	---DPNPFVS	DYKCDADHQR
<i>C. albicans</i>	SFKDLILRIR	ADEAKHREIN	HTFANLEQWQ	---DRNPFAL	KIK-DSDKPQ
<i>A. niger</i>	SMKDLLLYVR	ADEAKHREVN	HTLGNLNQAI	---DPNPHYA	KYK-DPTKAH
<i>A. fumigatus</i>	KMRDLLQYVR	<u>ADEAKHREVN</u>	HTLGNLQHN	---DPNPHYA	KYK-DPSKPH
<i>S. guttatum</i>	-----	-----	-----	---	
<i>G. max</i>	-----	-----	-----	---	
<i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	---	
<i>T. brucei</i>	SN-----QP	SGKTRTDFGS	EGAKTASN	KNV	
<i>N. crassa</i>	PVN--PALKP	TGFERAEVIG	-----	---	
<i>P. anserina</i>	P-N--PALKP	TGFERSEVIG	-----	---	
<i>C. albicans</i>	PNYNLDVTRP	QGWERKDLYL	-----	---	
<i>A. niger</i>	PNKGIADLKP	TGWEREEVI-	-----	---	
<i>A. fumigatus</i>	PTKGIENLKS	PGWEREEVI-	-----	---	

Figura 11: Alinhamento das sequências de proteína de oxidases alternativa de plantas (*S. guttatum*, *Glycine max* e *A. thaliana*), *T. brucei* e fungos (*N. crassa*, *P. anserina*, *C. albicans*, *A. niger* e *A. fumigatus*). Os resíduos de cisteína estão circulos e os domínios conservados estão sublinhados em vermelho.

4.7 Expressão heteróloga da oxidase alternativa em *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucarioto

Devido à presença de íntrons na sequência da oxidase alternativa, a caracterização bioquímica e

funcional deste gene foi realizada partindo-se da sequência de cDNA para clonagem em plasmídeo de expressão. Os estudos de expressão heteróloga foram realizados em *S. cerevisiae* como um modelo eucarioto, pois este não possui o gene da oxidase alternativa ou sua atividade enzimática detectada.

4.7.1 Clonagem da *aoxAf* em plasmídeo de expressão pYES2

A amplificação do cDNA da oxidase alternativa foi realizada utilizando-se o par de *primers* pYESaoxAf-F e pYESaoxAf-R (Tabela 2) que permitem a inserção no gene de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, além da inserção de uma sequência consensus KOZAK (ANNATGG) antes do códon de iniciação. Em eucariotos, a sequência KOZAK modula a tradução do mRNA, podendo aumentar a eficiência da expressão da proteína recombinante em leveduras (KOZAK, 1986).

As reações de PCR amplificaram uma banda única no tamanho aproximado de 1.000 pb, a qual foi inserida em plasmídeo de expressão pYES2.

4.7.2 Avaliação da atividade da oxidase alternativa em *S. cerevisiae*

Células de *S. cerevisiae* (INVSc1) foram transformadas com o plasmídeo pYESaoxAf e a expressão do gene foi induzida com galactose 2% (p/v). A avaliação da expressão foi realizada de acordo com item 3.5.9 e analisada por SDS-PAGE. No entanto, não foi possível observar nenhum aumento na expressão da oxidase alternativa (intensidade de alguma banda de ~40 kDa) ao longo do tempo (Figura 12).

Figura 12: Fotografia do gel de SDS-PAGE em tampão Tris-glicina (pH 8,3) referentes à fração solúvel de *S. cerevisiae* submetidos à indução da expressão da proteína AOXAf com galactose 2% (p/v), à 30°C.

M: Marcador de peso molecular

1: Tempo 0 de indução

2: Tempo 3 horas de indução

3: Tempo 5 horas de indução

4: Tempo 8 horas de indução

5: Tempo 24 horas de indução

Apesar de não se observar nenhum aumento na intensidade da banda, a atividade da oxidase alternativa foi detectada através da medida do consumo de oxigênio na presença de inibidores específicos para complexos da cadeia respiratória. Os ensaios polarográficos foram realizados em meio de cultura SC contendo 6×10^6 células/mL. As cepas foram cultivadas por 24 horas em meio contendo galactose 2% (p/v) para induzir a expressão do gene. O consumo de oxigênio das cepas controle (*S. cerevisiae*-INVSc1) e transformadas com o plasmídeo vazio (Figura 13-A e B), foram completamente inibidos pela adição de cianeto. Por outro lado, nas leveduras transformadas com o plasmídeo pYESaoxAf e induzidas com galactose 2% (p/v) (Figura 13-C e D), o consumo de oxigênio foi parcialmente inibido pela adição de KCN e sensível à adição de SHAM, inibidor específico da oxidase alternativa, mostrando uma expressão funcional do gene.

Figura 13: Efeito de inibidores sobre o consumo de oxigênio em *S. cerevisiae*. O meio SC completo e SC Ura⁻ foram utilizados como meio de respiração. A adição de KCN 1 mM e SHAM 2,5 mM estão indicados pela seta. Os números entre parêntese indicam o consumo de oxigênio pelas células em ηg átomos O/min/ 6×10^6 células.

A e B: *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae/pYES2*

C e D: *S. cerevisiae/pYESaoxAf*

4.7.3 Avaliação do crescimento das cepas de *S. cerevisiae* em meio não fermentativo e com inibição da cadeia respiratória

Após a verificação da expressão funcional da oxidase alternativa em *S. cerevisiae*, foram realizados ensaios para avaliação do papel desta proteína no crescimento das cepas em meio não-fermentativo e na sobrevivência da levedura sob condições de inibição da cadeia respiratória.

As cepas foram semeadas em diferentes diluições e após 48 horas à 30°C, avaliou-se a taxa de crescimento. Em meio não-fermentativo foi observada uma discreta diminuição na taxa de crescimento das cepas expressando a oxidase alternativa (Figura 14-A), enquanto que na presença de KCN as cepas expressando o gene adquiriram uma maior capacidade de crescimento (Figura 14-B).

Figura 14: Fotografia de uma cultura de 48 horas em diferentes diluições das cepas de *S. cerevisiae*: *Sc/pYES2* e *Sc/pYESaoxAf*

A: meio SC-Ura⁻ não-fermentativo;

B: meio SC-Ura⁻ não-fermentativo na presença de KCN 10 mM.

4.7.4 Imunodetecção da AOXAf com anticorpos anti-oxidase alternativa de *Sauromatum guttatum*.

A imunodetecção da oxidase alternativa foi realizada em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae*. 50 µg do lisado mitocondrial foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE. Após a separação, as

proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com anticorpo monoclonal anti-oxidase alternativa de *S. guttatum* (Figura 15).

Figura 15: **A:** Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida do isolado de mitocôndria de *S. cerevisiae*.

B: Fotografia de *Western blot* realizado para a detecção da AOXAf expressa em *S. cerevisiae*.

1: *S. cerevisiae*/pYESaoxAf induzido

2: *S. cerevisiae*/pYESaoxAf não induzido

Somente as mitocôndrias isoladas das cepas com a expressão induzida apresentaram marcação positiva em torno de aproximadamente 40 kDa (coluna 1), indicando a expressão da proteína alvo AOXAf em mitocôndrias de *S. cerevisiae*, como previamente verificado nos experimentos de consumo de oxigênio e

de crescimento das cepas em condições não-fermentativas e de inibição da cadeia respiratória.

4.8 Avaliação da expressão e da atividade da oxidase alternativa na presença de radicais livres

Estudos em diversas espécies demonstraram um aumento na atividade e na expressão da oxidase alternativa mediada por diferentes radicais livres.

Desta forma, avaliaram-se o comportamento da oxidase alternativa em conídios de *A. fumigatus* sob condições de estresse oxidativo, na presença de doadores de radicais livres, como paraquat e menadiona.

A atividade da AOXAf foi determinada através da medida do consumo de oxigênio após a adição de KCN 1 mmol/L ao meio de respiração. Culturas controle de *A. fumigatus* apresentaram uma respiração resistente a cianeto correspondente a 35-40% do consumo total de oxigênio. Em culturas tratadas com paraquat 5,0 mmol/L ou menadiona 0,5 mmol/L, a atividade da oxidase alternativa representou 70-85% do consumo total de oxigênio (Figura 16).

Figura 16: Indução da respiração resistente a cianeto em cultura de *A. fumigatus* cultivado na presença de paraquat e menadiona. A atividade da oxidase alternativa foi determinada polarograficamente em meio de respiração contendo KCl 1,7 mmol/L, MgCl₂ 5,0 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L, KH₂PO₄ 10 mmol/L, glicose 2% (p/v), Hepes-KOH 50 mmol/L (pH 7,4) e adicionado de KCN 1 mmol/L (volume final 1,8 mL) a 30°C. * $p < 0,05$.

Para verificar se os níveis de transcrição da oxidase alternativa também se apresentavam aumentados nas condições descritas, determinou-se o nível de expressão de mRNA por PCR quantitativo em tempo real. Como mostrado na figura 17, nos conídios tratados com menadiona e paraquat houve um aumento de aproximadamente 4 vezes nos níveis de transcritos de mRNA da oxidase alternativa.

Figura 17: Nível de expressão do gene *aoxAf* em culturas de *A. fumigatus* expostas a paraquat e menadiona. Os resultados foram normalizados pelo nível de expressão do gene constitutivo β -tubulina. * $p < 0,05$; # $p < 0,01$.

5. Discussão

Uma importante característica das mitocôndrias de plantas, de alguns fungos e parasitas é a presença de componentes alternativos em suas cadeias respiratórias, com transferência de elétrons desacoplada da síntese de ATP (JOSEPH-HORNE et al., 2000). Um destes componentes alternativos é a oxidase alternativa que é responsável por catalisar a redução do oxigênio molecular proveniente da ubiquinona, resultando na formação de água (MOORE & SIEDOW, 1991).

Os primeiros relatos sobre a presença de uma proteína alternativa no fluxo de elétrons mitocondrial, foram descritos em plantas em 1929 (HENRY & NYNS, 1975) e em 1966, foi identificada a presença de um componente alternativo na cadeia respiratória de leveduras (VEIGA et al., 2003).

Apesar dos numerosos estudos, o papel da AOX não está totalmente elucidado. Acredita-se que em fungos sua atividade esteja relacionada à sobrevivência do fungo em macrófagos de células hospedeiras, baseando-se nas evidências de sua função bioenergética e de defesa antioxidante (PAPA & SKULACHEV, 1997; JOSEPH-HORNE et al., 2001).

A caracterização mitocondrial de *A. fumigatus*, realizada em nosso laboratório, evidenciou a presença

de componentes alternativos na cadeia respiratória, como NADH desidrogenases alternativas, proteína desacopladora e oxidase alternativa (TUDELLA et al., 2004). Assim, para o melhor entendimento destas vias alternativas, foi realizada a caracterização molecular e bioquímica da oxidase alternativa de *A. fumigatus*.

A pesquisa do gene da oxidase alternativa iniciou-se a partir da construção e *screening* de uma biblioteca genômica parcial de *A. fumigatus*. Após o sequenciamento das amostras provenientes da biblioteca, foi identificado o gene da oxidase alternativa (*aoxAf*).

O alinhamento entre as sequências genômica e de cDNA, evidenciou um gene com sequência interrompida por 2 introns, os quais apresentam nas extremidades 5' e 3', sequências dinucleotídicas conservadas necessárias para sua excisão. A extremidade 5' apresenta a sequência dinucleotídica GT como sítio doador para *splicing* (*splicing donation site*), enquanto as extremidades 3' apresentam a sequência AG como sítio aceitor de *splicing* (*splicing acceptor site*) (CHEN & ZHANG, 1998; LONG & DEUTSCH, 1999).

Após o *splicing*, o gene *aoxAf* codifica uma proteína de 352 aminoácidos. Os alinhamentos desta

sequência deduzida com outras sequências e as análises hidropáticas revelaram um perfil muito similar àqueles descritos para outros fungos. Encontram-se quatro domínios altamente conservados (LET, NERMHL, LEEA e RADE-H) que estão relacionados com a estrutura e atividade da enzima. Os resíduos de glutamato e histidina, presentes nestes domínios são responsáveis pela interação com dois átomos de ferro (MOORE et al., 2008). Esta característica de coordenação com átomos de ferro classifica esta proteína, bem como todas as outras oxidases alternativas já descritas, como pertencente à subunidade R₂ das ribonucleases (SIEDOW & UMBACH, 2000). Resíduos de tirosina apresentam um papel de fundamental importância, pois estão dispostos próximos ao sítio ligante de ferro na hélice 3 e são supostamente responsáveis pela rotação desta hélice. Além disso, acredita-se que estes resíduos estejam diretamente envolvidos na interação da oxidase alternativa com a ubiquinona (*Ubiquinona-binding site*) (ALBURY et al., 2002).

Atualmente, são propostos dois modelos estruturais para a AOX com a presença de quatro hélices que se organizam na membrana mitocondrial interna de forma distinta (ALBURY et al., 2002). O

primeiro propõe a presença de duas α -hélices hidrofílicas transmembranas que são conectadas por outra α -hélice localizada no espaço intermembrana (SIEDOW & UMBACH, 1995; MOORE et al., 1995). O segundo modelo propõe uma disposição interfacial, ao invés da conformação transmembrana, com as duas α -hélices hidrofílicas voltadas para a matriz mitocondrial (ANDERSSON et al., 1999; BERTHOLD et al., 2000). A análise da sequência deduzida de aminoácidos da oxidase alternativa de *A. fumigatus* revelou as quatro hélices descritas como responsáveis por sua organização estrutural, corroborando os dois modelos estruturais propostos.

Em oxidases alternativas de plantas, além das características já descritas, foram identificados resíduos de cisteína conservados na porção N-terminal da proteína. Esta característica confere às plantas se organizarem em uma estrutura dimérica, decorrente da interação por pontes dissulfeto, entre as cisteínas presentes em cada monômero (UMBACH & SIEDOW, 1993; UMBACH et al., 2006). A associação entre as duas subunidades monoméricas torna esta oxidase inativa, que quando reduzida, é regulada positivamente por α -

ceto ácidos, como o piruvato (MILLAR et al., 1993; ONDA et al., 2007).

Em contraste as AOX presentes em mitocôndria de plantas, a sequência de *A. fumigatus* não apresenta o resíduo de cisteína na porção N-terminal. Esta característica confere uma estrutura monomérica para esta proteína, como já descrito para outros fungos e para *T. brucei* (CHAUDHURI et al., 2005), além de sugerir mecanismos de regulação distintos daqueles realizados pelo piruvato.

Uma vez caracterizada a sequência do gene da oxidase alternativa, a expressão heteróloga em cepas de *S. cerevisiae* consiste em uma abordagem promissora para a caracterização cinética e energética, podendo fornecer um melhor entendimento dessa via alternativa (VEIGA et al., 2003).

Diferente de plantas, mamíferos e outros fungos, as mitocôndrias de *S. cerevisiae* não apresentam o complexo I mitocondrial e as proteínas da via alternativa como a proteína desacopladora e a oxidase alternativa (JOSEPH-HORNE et al., 2001). Devido a esta última característica, a cepa INVSc1 de *S. cerevisiae* foi utilizada como modelo eucarioto para a expressão heteróloga do gene *aoxAf*.

A atividade funcional desta proteína foi determinada polarograficamente. Como esperado, a respiração em cepas de *S. cerevisiae* não transformadas ou transformadas apenas com o vetor pYES2, foi totalmente inibida na presença de KCN. Por outro lado, nas cepas expressando a AOXAf foi observada uma respiração resistente a cianeto e sensível a SHAM e uma maior capacidade de crescimento resistente a cianeto, diferentemente das outras cepas que cessaram o crescimento na presença de KCN.

A contribuição desta proteína durante o crescimento das cepas de *S. cerevisiae* em meio não-fermentativo, provocou um crescimento mais lento nas cepas expressando AOXAf, sugerindo, *in vivo*, uma característica dissipadora de energia para esta proteína. Estes resultados corroboram os ensaios em cepas de *Schizosaccharomyces pombe* expressando uma AOX isolada de *S. guttatum*, em que foi observada uma diminuição de 18% na sua taxa de crescimento em meio não-fermentativo (AFFOURTIT et al., 1999). Além disso, cepas de *S. cerevisiae* expressando a AOX isolada de *H. anomala*, foram observadas uma queda de 30% na taxa de crescimento desta levedura. Estas características são decorrentes do aumento da expressão das proteínas

envolvidas no ciclo do ácido cítrico, provocado pela presença da AOX, acarretando em dissipação de energia em *S. cerevisiae* (MATHY et al., 2006; VEMURI et al., 2007).

A eficiente expressão da AOXAf foi confirmada por técnicas de *Western blot* em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae* provenientes de uma cultura com expressão induzida. O anticorpo monoclonal anti-AOX de *S. guttatum* possui um sítio de reconhecimento contendo 12 resíduos de aminoácidos, localizados na região C-terminal do gene e altamente conservada entre as oxidases alternativas (ELTHON et al., 1989). A análise desta sequência de AOXAf revelou divergência em apenas dois destes aminoácidos, nas posições 6 e 9, o que não prejudicou o reconhecimento pelo anticorpo (FINNEGAN et al., 1999). Desta forma, a presença de uma banda em torno de 40 kDa indica que a expressão da AOXAf em *S. cerevisiae* possui o produto recombinante corretamente direcionado para as mitocôndrias das células hospedeiras, onde é funcionalmente ativa.

Em eucariotos, as mitocôndrias são as principais produtoras de ERO, incluindo o anion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. A formação e o acúmulo de ERO podem causar danos celulares em uma

variedade de macromoléculas, podendo levar até à morte (MAXWELL et al., 1999). Assim, mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos são essenciais para a proteção celular, dentre eles as oxidases alternativas. Em diferentes espécies tem sido mostrado o aumento na expressão da AOX em decorrência da presença de ERO, sugerindo seu importante papel nos mecanismos de defesa antioxidante (MINAGAWA et al., 1992; WAGNER, 1995; WAGNER & MOORE, 1997).

Em plantas, a inibição da AOX provocada pela adição de SHAM acarretou aumento na geração de H_2O_2 (POPOV et al., 1997) e na morte celular programada (VANLERBERGHE et al., 2002), mostrando a importante contribuição da oxidase alternativa na proteção contra danos oxidativos.

Em *A. fumigatus*, a presença de agentes pró-oxidantes provocou um aumento de 70 a 85% na atividade da AOXAf e de 5 vezes nos níveis de expressão do RNAm. Estes resultados mostram que a super-expressão do gene *aoxAf* possa ser decorrente de uma resposta ao estresse oxidativo presente nas células do fungo. Além disso, o aumento na expressão pode ser um mecanismo de defesa antioxidante, decorrente dos radicais livres formados na mitocôndria do fungo e também em resposta

a ERO geradas por neutrófilos e macrófagos durante a infecção fúngica (HELMERHORST et al., 2005).

6. Conclusões

Os resultados apresentados nos permitem concluir que a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da oxidase alternativa de *Aspergillus fumigatus* apresenta elevada similaridade com outras AOXs fúngicas, além de possuir uma estrutura monomérica com domínios hidrofóbicos conservados. A expressão heteróloga deste gene em *S. cerevisiae* conferiu uma respiração resistente a cianeto e sensível a SHAM e provoca uma discreta diminuição na multiplicação celular.

Em *A. fumigatus*, a presença de radicais livres provocou um aumento na expressão de *aoxAf* e na atividade da AOXAf, ressaltando sua importante contribuição em mecanismos de estresse oxidativo.

7. Referências bibliográficas

AFFOURTIT, C.; ALBURY, M.S.; KRAB, K.; MOORE, A.L.
Functional expression of the plant alternative
oxidase affects growth of the yeast
Schizosaccharomyces pombe. **J. Biol. Chem.**,
Baltimore, v.274, p.6212-6218, 1999.

AKPOGHENETA, O.; GIL-LAMAINERE, C.; MALOUKOU, A.;
ROILIDES, E.; EUROFUNG NETWORK. Antifungal activity
of human polymorphonuclear and mononuclear
phagocytes against non-fumigatus *Aspergillus*
species. **Mycoses**, Berlin, v.46, p.77-83, 2003.

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 Res.**, London, v.25,
p.3389-3402, 1997.

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

ALMEIDA, R.; ALLSHIRE, R.C. RNA silencing and genome
regulation. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v.15,
p.251-258, 2005.

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

- 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. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v.52, p.321-328, 2008.
- BEFFA, T.; STAIB, F.; FISCHER, J.L.; LYON, P.F.; GUMOWSKI, P.; MARFENINA, O.E.; et al. Mycological control and surveillance of biological waste and compost. **Med Mycol.**, Oxford, v.36, p.137-145, 1998.
- BERTHOLD, D.A.; ANDERSSON, M.E.; NORDLUND, P. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1460, p.241-245, 2000.
- BODEY, G.P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.8, p.413-437, 1989.
- BORECKÝ, J.; VERCESI A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. **Biosci Rep.**, New York, v.25, p.271-286, 2005.
- BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.70, p.2837-2839, 1973.

- BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E.; SLATER, E.C. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.46, p.955-1026, 1977.
- BRAKHAGE, A.A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: The molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.56, p.433-455, 2002.
- BRAKHAGE, A.A.; LIEBMANN B. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. **Med. Mycol.**, Oxford, v.43, p.75-82, 2005.
- CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research, In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (ED). **Biochemical Toxicological**, Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.
- CARTER, W.O.; NARAYANAN, P.K.; ROBISON, J.P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. **J. Leukoc.Biol.**, New York, v.55, p.253- 258, 1994.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, New York, v.17, p.65-134, 1956.
- CHAUDHURI, M.; HILL, G.C. Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.83, p.125-129, 1996.

- CHAUDHURI, M.; OTT, R.D.; WILLIAMS, L.S.S.; HILL, G.C.
The trypanosome alternative oxidase exists as a monomer in *Trypanosoma brucei* mitochondria. **Parasitol. Res.**, Berlin, v.96, p.178-183, 2005.
- CHAUDHURI, M.; OTT, R.; HILL, G. C. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, v.22, p.484-491, 2006.
- CHEN, T.; ZHANG, M. Pombe: a gene-finding and exon-intron structure prediction system for fission yeast. **Yeast**, New York, v.14, p.701-710, 1998.
- CHRYSSANTHOU, E.; LOEBIG, A.; SJÖLIN, J. Post-antifungal effect of amphotericin B and voriconazole against germinated *Aspergillus fumigatus* conidia. **Journal of Antimicrob. Chemother.**, London, v.61, p.1309-1311, 2008.
- COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.94, p.10233-10238, 1997.
- CZARNA, M.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.579, p.3136-3140, 2005.

- De BACKER, M.D.; RAPONI, M.; ARNDT, G.M. RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v.5, p.323-329, 2002.
- De VRIES, R.P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v.65, p.497-522, 2001.
- 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 Lett.**, Amsterdam, v.509, p.430-434, 2001.
- DENNING, D.W. Invasive Aspergillosis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.26, p.781-805, 1998.
- DUFOUR, E.; BOULAY, J.; RINCHEVAL, V.; SAINSARD-CHANET, A. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.97, p.4138-4143, 2000.
- ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.15, p.188-200, 2001.
- ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L.; MCINTOSH, L. Monoclonal antibody to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. **Plant Physiol.**, Lancaster, v.89, p.1311-1317, 1989.

FEINBURG, A.P.; VOLGESTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, New York., v.132, p.6-13, 1983.

FEINBURG, A.P.; VOLGESTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, New York., v.137, p.266-267, 1984.

FINNEGAN, M.P.; WOODING, R.A.; DAY, A.D. An alternative oxidase monoclonal antibody recognizes a highly conserved sequence among alternative oxidase subunits. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.447, p.21-24, 1999.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v.391, p.806-811, 1998.

FOWLER, T.; BERKA, R.M.; WARD, M. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. **Curr. Genet.**, New York, v.18, p.537-545, 1990.

GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.17, p.11369-11377, 1997.

- 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. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v.223, p.24-32, 1990.
- GRIGOLAVA, I.V.; KSENZENKO M.; KONSTANTINOB A.A.; TIKHONOV A.N.; KERIMOV T.M. Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles. **Biokhimiia**, Moscow, v.45, p.75-82, 1980.
- HAINES, J. *Aspergillus* in compost: Straw man or fatal flaw. **Biocycle**, Emmaus, v.6, p.32-35, 1995.
- HAMILTON, A.J.; HOLDOM, M.D. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. **Med Mycol.**, Oxford, v.37, p.375-389, 1999.
- HARMAN, D. A theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, Washington, v.11, p.298-300, 1956.
- HARMAN, D. The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.78, p.7124-7128, 1981.
- HARMAN, D. Aging and oxidative stress. **J. Int. Fed. Clin. Chem.**, Shelton, v.10, p.24-27, 1998.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.54, p.1015-1069, 1985.

HATTORI, T.; HONDA, Y.; KINO, K.; KIRIMURA, K.
Expression of alternative oxidase gene (*aox1*) at the stage of single-cell conidium in citric acid-producing *Aspergillus niger*. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v.105, p.55-57, 2008.

HAYAFUNE, M.; MIYANO-KUROSAKI, N.; TAKAKU, H.; PARK, W.S. Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, Monticello, v. 25, p.795-799, 2006.

HELMERHORST, E.J.; STAN, M.; MURPHY, M.P.; SHERMAN, F.; OPPENHEIM, F.G. The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. **Mitochondrion**, Amsterdam, v.5, p.200-211, 2005.

HEMPEL, S.L.; BUETTNER, G.R.; O'MALLEY, Y.O.; WESSELS, D.A.; FLAHARTY, D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.27, p.146-159, 1999.

HENRY, C.; MOUYNA, I.; LATGÉ J.P. Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. **Curr Genet.**, New York, v.4, p.277-84, 2007.

HENRY, M.F.; NYNS, E.D. Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. **Subcell Biochem.**, London, v.4, p.1-65 1975.

HOGABOAM, C.M.; CARPENTER, K.J.; SCHUH, J.M.; BUCKLAND, K.F. *Aspergillus* and asthma-any link? **Med Mycol.**, Oxford, v.43, p.197-202, 2005

HOHL, T.M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryot Cell.**, Washington, v.6, p.1953-63, 2007.

HUANG X. On global sequence alignment. **Comput. Appl. Biosci.**, Oxford, v.10, p.227-235, 1994.

ITO, J.I.; LYONS, J.M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.186, p.879-871, 2002.

JEZEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter, v.37, p.2478-2503, 2005.

JIDONG, J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. **Curr Opin Cell Biol.**, Filadélfia, v.20, p.214-221, 2008.

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

JOSEPH-HORNE, T.; BABIJ, J.; WOOD, P.M.; HOLLOMON, D.; SESSIONS, R.B. New sequence data enable modeling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by piruvate. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.481, p.141-146, 2000.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.W.; WOOD, P.M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1504, p.179-195, 2001.

JOU, M.J.; JOU, S.B.; CHEN, H.M.; LIN, C.H.; PENG, T.L. Critical role of mitochondrial reactive oxygen species formation in visible laser irradiation-induced apoptosis in rat brain astrocytes (RBA-1), **J. Biomed. Sci.**, New York, v.9, p.507-516, 2002.

KAUR, G.; LOHIA, A. Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v.320, p.1118-122, 2004.

KIM, J.H.; CAMPBELL, B.C.; MAHONEY, N.; CHAN, K.L.; MAY, G.S. Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.101, p.181-189, 2006.

KIRIMURA, K.; YODA, M.; USAMI, S. Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. **Curr. Genet.**, New York, v.34, p.472-477, 1999.

- KIRIMURA, K.; YODA, M.; SHIMIZU, H.; SUGANO, S.; MIZUNO, M.; KINO, K.; USAMI, S. Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalised by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. **Biosci. Biotech. Bioch.**, Tokyo, v.64, p.2034-2039, 2000.
- KONNO, N.; ISHII, M.; NAGAI, A.; WATANABE, T. et al. Mechanism of *Candida albicans* transformation in response to changes of pH. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.29, p.923-926, 2006.
- KOZAK M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, Cambridge, v.44, p.283-292, 1986.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropatic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, New York, v.157, p.105-132, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LANGFELDER, K.; JAHN, B.; GEHRINGER, H.; SCHMIDT, A.; WANNER, G.; BRAKHAGE, A.A. Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. **Med. Microbiol. Immunol.**, New York, v.187, p.79-89, 1998.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.12, p.310-350, 1999.

LATGÉ, J.P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Cur. Opin. Microbiol.**, London, v.5, p.355-58, 2002.

LEDERBERG, E.M.; COHEN, S.N. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.**, Washington, v.119, p.1072-1074, 1974.

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

LI, Q.; RITZEL, R.G.; MCLEAN, L.L.; MCINTOSH, L.; KO, T.; BERTRAND, H.; NARGANG, F.E. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. **Genetics**, Baltimore, v.142, p.129-140, 1996.

LONG, M.; DEUTSCH, M. Association of intron phases with conservation at splice site sequence and evaluation of spliceosomal introns. **Mol. Biol. Evol.**, New York, v.16, p.1528-1534, 1999.

LORIN, S.; DUFOUR, E.; BOULAY, J.; BEGEL, O.; MARSY, S.; SAINSARD-CHANET, A. Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.42, p.1259-1267, 2001.

LUTHER, K.; ROHDE, M.; STURM, K.; KOTZ, A.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. **Microbes Infect.**, Paris, v.10, p.175-84, 2008.

MAGNANI, T.; SORIANI, F.M.; MARTINS, V.P.; NASCIMENTO, A.M.; TUDELLA, V.G.; CURTI, C.; UYEMURA, S.A. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.271, p.230-238, 2007.

MAHMOOD-UR-RAHMAN; ALI, I.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. **Biotechnol. Adv.**, Oxford, v.26, p.202-209, 2008.

MARR, K.A.; KOUDADOUST, M.; BLACK, M.; BALAJEE, S.A. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.8, p.1240-1247, 2001.

MATHY, G.; NAVET, R.; GERKENS, P.; LEPRINCE, P.; PAUW, E.; GOFFART-SLUSE, M.C.; SLUSE, E.F.; DOUETTE, P. *Saccharomyces cerevisiae* mitoproteome plasticity in response to recombinant alternative ubiquinol oxidase. **J. Proteome Res.**, Washington, v.5, p.339-348, 2006.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.96, p.8271-8276, 1999.

MCDONALD, A.E.; VANLERBERGHE, G.C. Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the *Sargasso Sea*. **Gene**, Amsterdam, v.349, p.15-24, 2005.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v.431, p.343-349, 2004.

MEZEI, L.M.; STORTS, D.R. **PCR technology: current innovation**. Flórida, 1994.

MILANI, G.; JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.508, p.231-235, 2001.

- MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T.; WHELAN, J.; DAY .D.A.
Organic acid activation of the alternative oxidase
of plant mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.329,
p.259-262, 1993.
- MINAGAWA N, KOGA S, NAKANO M, SAKAJO S, YOSHIMOTO A.
Possible involvement of superoxide anion in the
induction of cyanide-resistant respiration in
Hansenula anomala. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.302,
p.217-219, 1992.
- MINAGAWA, N.; YABU, Y.; KITA, K.; NAGAI, K.; OHTA, N.;
MEGURO, K.; SAKAJO, S.; YOSHIMOTO, A. An antibiotic,
ascofuranone, specifically inhibits respiration and
in vitro growth of long slender bloodstream forms of
Trypanosoma brucei brucei. **Mol. Biochem. Parasitol.**,
Amsterdam, v.84, p.271-280, 1997.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron
and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of
mechanism. **Nature**, London, v.191, p.144-148, 1961.
- MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N. The regulation and nature of
the cyanide-resistant alternative oxidase of plant
mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam,
v.1059, p.121-140, 1991.
- MOORE, A.L.; UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Structure-
function relationships of the alternative oxidase of
plant mitochondria: a model of the active site. **J.
Bioenerg. Biomembr.**, London, v.27, p.367-377, 1995.

MOORE, A.L.; ALBURY, M.S.; CRICHTON, P.G.; AFFOURTIT, C. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.11, p.478-481, 2002.

MOORE, A.L.; CARRE, J.E.; AFFOURTIT, C.; ALBURY, M.S.; CRICHTON, P.G.; KITA, K.; HEATHCOTE, P. Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1777, p.327-30, 2008.

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

MOUYNA, I.; HENRY, C.; DOERING, T.L.; LATGE J.P. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.237, p.317-324, 2004.

MURATA, T.; KADOTANI, N.; YAMAGUCHI, M.; TOSA, Y.; MAYAMA, H.; NAKAYASHIKI, H. siRNA-dependent and -independent post-transcriptional cosuppression of the TR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.35, p.5987-5994, 2007.

NABHAN, J.F.; EL-SHEHABI, F.; PATOCKA, N.; RIBEIRO, P. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: Bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. **Exp. Parasitol.**, New York, v.117, p.337-347, 2007.

- NAKAYASHIKI, H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.579, p.5950-5957, 2005.
- NIHEI, C.; FUKAI, Y.; KITA, K. Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1587, p.234-239, 2002.
- NIHEI, C.; FUKAI, Y.; KAWAI, K.; OSANAI, A.; YABU, Y.; SUZUKI, T.; OHTA, N.; MINAGAWA, N.; NAGAI, K.; KITA, K. Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.538, p.35-40, 2003.
- NIERMAN, W.C.; PAIN, A.; ANDERSON, M.J.; WORTMAN, J.R.; et al. Genome sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, London, v.438, p.1151-1156, 2005.
- NOCTOR, G.; De PAEPE, R.; FOYER, C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants, **Trends Plant Sci.**, Kidlington, v.12, p.125-134, 2007.
- NOGUCHI, K.; TERASHIMA, I. Responses of spinach leaf mitochondria to low N availability, **Plant Cell Environ.**, Oxford, v.29, p.710-719, 2006.
- NOLAN, T.; BRACCINI, L.; AZZALIN, G.; DE TONI, A.; MACINO, G.; COGONI, C. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.33, p.1564-1573, 2005.

ONDA, Y.; KATO, Y.; ABE, Y.; ITO, T.; ITO-INABA, Y.; MOROHASHI, M.; ITO, Y.; ICHIKAWA, M.; MATSUKAWA, K.; OTSUKA, M.; KOIWA, H.; ITO, K. Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.581, p.5852-5858, 2007.

ORDOG, S.H.; HIGGINS, V.J.; VANLERBERGHE, G.C. Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play role in the hypersensitive response. **Plant Physiol.**, Lancaster, v.129, p.1858-1865, 2002.

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

OTT, R.; CHIBALE K.; ANDERSON, S.; CHIPELEME, A.; CHAUDHURI, M.; GUERRAH, A.; COLOWICK, N.; HILL, G.C. Novel inhibitors of the trypanosome alternative oxidase inhibit *Trypanosoma brucei brucei* growth and respiration. **Acta Trop.**, v.100, p.172-184, 2006.

PAPA, S.; SKULACHEV, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v.174, p.305-319, 1997.

PECK, R. A one-plate assay for macrophage bactericidal activity. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.82, p.131-40, 1985.

- PHILIPPE, B.; IBRAHIM-GRANET, O.; PREVOST, M.C.;
GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; SANCHEZ PEREZ, M.; VAN DER
MEEREN, A.; LATGE, J.P. Killing of *Aspergillus*
fumigatus by alveolar macrophages is mediated by
reactive oxidant intermediates. **Infect Immun.**,
Washington, v.71, p.3034-3042, 2003.
- PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and
Penicillium in human and animal health. **J. Med. Vet.**
Mycol., Oxford, suppl. I, v.32, p.17-32, 1994.
- POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV,
A.A. Inhibition of the alternative oxidase
stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria.
FEBS Lett., Amsterdam, v.415, p.87-90, 1997.
- RAMSDALE, M. Programmed cell death in pathogenic
fungi. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam,
v.1783, p.1369-1380, 2008.
- RAPPLEYE, C.A.; ENGLE, J.T.; GOLDMAN, W.E. RNA
interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates
a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol.**
Microbiol., Oxford, v.53, p.153-165, 2004.
- RUY, F.; VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; Inhibition
of specific electron transport pathways leads to
oxidative stress and decreased *Candida albicans*
proliferation. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York,
v.38, p.129-135, 2006.

- RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; COOSEMANS, J.; DEPRINS, K.; SWINGS, J. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.94, p.127-137, 2003.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAISHO, D.; NAMBARA, E.; NAITO, S.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, Boston, v.35, p.585-594, 1997.
- SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1090, p.102-108, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: **A laboratory manual**. Ed 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v.5, p.379-385, 2002.
- SEN, N.; MAJUMDER, H.K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v.14, p.839-846, 2008.
- SERRANO-GOMEZ, D.; DOMINGUEZ-SOTO, A.; ANCOCHEA, J.; JIMENEZ-HEFERNAN, J.A.; LEAL, J.A.; CORBI, A.L. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophage. **J. Immunol.**, Baltimore, v.173, p.5635-5643, 2004.
- SHAUKAT, A.; BAKRI, F.; YOUNG, P.; HAHN, T.; BALL, D.; BAER, M.R.; WETZLER, M.; SLACK, J.L.; LOUD, P.; CZUCZMAN, M.; MCCARTHY, P.L.; WALSH, T.J.; SEGAL, B.H. Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristics. **Mycopathologia**, The Hague, v.159, p.181-188, 2005.
- SHIBUYA, K.; PARIS, S.; ANDO, T.; NAKAYAMA, H.; HATORI, T.; LATGÉ, J.P. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, Tokyo, v.47, p.249-255, 2006.

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

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

SINGH, N.; PATERSON, D.L. Aspergillus infections in transplant recipients. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, p.44-69, 2005.

SKULACHEV, V.P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers. **IUBMB Life**, London, v.57, p.305-10, 2005.

SOUTHERN, C.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. **J. Mol. Biol.**, New York, v.98, 1975.

SUGIE, A.; MURAI, K.; TAKUMI, S. Alteration of respiration capacity and transcript accumulation level of alternative oxidase genes in necrosis lines of common wheat. **Genes Genet. Syst.**, Mishima, v.82, p.231-239, 2007.

- SUZUKI, T.; NIHEI, C.; YABU, Y.; HASHIMOTO, T.; SUZUKI, M.; YOSHIDA, A.; NAGAI, K.; HOSOKAWA, T.; MINAGAWA, N.; SUZUKI, S.; KITA, K.; OHTA, N. Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone. **Parasitol Int.**, Amsterdam, v.53, p.235-45, 2004.
- TAUBITZ, A.; BAUER, B.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *A. fumigatus*. **Current Microbiology**, New York, v.54, p.354-360, 2007.
- TEKAIA, F.; LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v.8, p.385-392, 2005.
- TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G.G.; ZABICKY-ZISSMAN, J.H.; LOCKINGTON, R.A.; DAVIES, R.W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, Amsterdam, v.26, p.205-221, 1983.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.
- TSITSIGIANNIS, D.I.; BOK, J.W.; ANDES, D.; NIELSEN, K.F.; FRISVAD, J.C.; KELLER, N.P. *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v.73, p.4548-4559, 2005.

- 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*. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Exeter, v.36, p.162-172, 2004.
- TURRENS J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, Oxford, v.44, p.552-335, 2003.
- TURRENS J.F. and BOVERIS A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.191, p.421-27, 1980.
- UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiol.**, Lancaster, v.103, p.845-854, 1993.
- UMBACH, A.L.; FIORANI, F.; SIEDOW, J.N. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. **Plant Physiol.**, Lancaster, v.139, p.1806-1820, 2005.
- UMBACH, A.L.; NG, V.S.; SIEDOW, J.N. Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1757, p.135-42, 2006.

- VAN BURIK, J.A.H.; SCHRECKISE, R.W.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A.; MYERSON, D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Med. Mycol.**, Oxford, v.36, p.299-303, 1998.
- VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, v.38, p.703-734, 1997.
- VANLERBERGHE, G.C.; ROBSON, C.A.; YIP, J.Y. Induction mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. **Plant Physiol.**, Lancaster, v. 129, p.1829-1842, 2002.
- VEIGA, A.; ARRABAÇA, J.D.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeast. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v.3, p.239-245, 2003.
- VEMURI, G.N.; EITEMAN, M.A.; MCEWEN, J.E.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.104, p. 2402-2407, 2007.
- VERDOES, J.C.; PUNT, P.J.; STOUTHAMER, A.H.; VAN DEN HONDEL, C.A. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. **Gene**, Amsterdam, v.145, p.179-187, 1994.

- VERMA, N.K.; DEY, C.S. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. **J. Clin. Pharm. Ther.**, Oxford, v.29, p.395-404, 2004.
- VONK, A.G.; WIELAND, C.W.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.49, p.55-62, 2002.
- WAGNER, A.M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.368, p.339-342, 1995.
- WAGNER, A.M.; MOORE, A.L. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism. **Biosci. Rep.**, London, v.17, p.319-333, 1997.
- WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Suppl.I, v.95, p.153-158, 2000.
- YOSHIDA, K.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. **Plant Cell Physiol.**, Tokyo, v.48, p.606-614. 2007.

Apêndices

Apêndice 1 – Meios de cultivo

1.1. YG

Dextrose	20 g
Extrato de Levedura	5 g
Suplemento de vitaminas	10 mL
Solução de elementos traço	1 mL
Agar	18 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio, com exceção do suplemento de vitaminas foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada para pH 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. O suplemento de vitaminas foi adicionado ao meio entre 40 e 50°C.

1.2. LB (Lúria Bertani)

Bactotripton	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	18 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada

para pH 7,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

1.3. SOC

Triptona	20 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 mmol/L
KCl	2 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
Glicose	20 mmol/L
Água destilada q.s.p	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada para pH 7,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

1.4. YPD

Peptona (Oxoid)	20 g
Extrato de levedura (Oxoid)	10 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada (90% do volume final) e

o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kg/cm^2 por 20 minutos. Em seguida foi adicionado a este meio 100 mL de uma solução estoque estéril de glicose 20% (p/v).

1.5. SC

Base de nitrogênio para		
levedura Difco™)		0,67% (p/v)
Fonte de carbono:		
(ou) Glucose.....		2,0% (p/v)
(ou) Rafinose.....		2,0% (p/v)
(ou) Galactose.....		2,0% (p/v)
Adenina	Arginina	} 0,01% (p/v)
Lisina	Leucina	
Cisteína	Treonina	
Triptofano	Uracila	
Ácido aspártico	Fenilalanina	} 0,005% (p/v)
Histidina	Tirosina	
Isoleucina	Serina	
Metionina	Valina	
Prolina		
H ₂ O deionizada q.s.p		1.000 mL

O meio SC é definido como um meio mínimo de cultura de leveduras. Os reagentes foram dissolvidos em 900 mL de água deionizada (800 mL se for preparar o meio contendo rafinose como fonte de carbono) e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 100 mL de uma solução estoque estéril de dextrose 20% (p/v) ou 200 mL de solução estoque estéril de rafinose

10% (p/v). Para o meio SC seletivo foi omitido o aminoácido uracila.

1.6. SC não-fermentativo

O meio SC não fermentativo é composto pelos componentes descritos acima na presença de 0,05% galactose, 1% glicerol e 2% etanol.

1.7. Meio Mínimo

Solução de sais	5,0% (v/v)
Dextrose	1,0% (p/v)
Elementos traço	0,1% (v/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. No protocolo de transformação foi adicionado ágar 1% ou 2% (p/v) para os meios sólidos. De forma semelhante, sacarose 1 mol/L foi adicionada a estes meios como estabilizante osmótico, mas neste caso a esterilização foi realizada a 110°C por 30 minutos para se evitar a caramelização da sacarose.

Apêndice 2 – Soluções e tampões

2.1. Solução estoque de vitaminas

Hidrocloreto de tiamina	6,0 mg
Niacina	6,0 mg
Pantotenato de calico	6,0 mg
Inositol	1,0 mg
Biotina	0,1 mg
Riboflavina	1,0 mg
Ácido fólico	10,0 mg
Cloreto de colina	10,0 mg
Hidrocloreto de piridoxina	10,0 mg
Água deionizada qsp	100,0 mL

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas e dissolvidas na ordem listada. O processo de esterilização foi realizado por filtração (membrana 0,22 μm) e a solução de vitaminas foi adicionada ao meio de cultura estéril e resfriado.

2.2 Solução de Elementos Traços

ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,0 g
H ₃ BO ₃	5,5 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	2,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5 g
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,8 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,8 g
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,55 g
EDTA	25,0 g
Água destilada q.s.p.	100,00
	mL

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas e dissolvidas na ordem listada, em 80 mL de água destilada. A solução foi fervida e após resfriamento foi ajustada para pH entre 6,5 e 6,8 com KOH e o volume ajustado para 100 mL.

2.3. Solução de sais para meio mínimo

NaNO ₃	120,0 g
KCl	10,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,4 g
KH ₂ PO ₄	30,0 g
Água destilada q.s.p	1.000,0 mL

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e em seguida esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.4. Salina fosfato tamponada (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Água destilada q.s.p	1.000,00 mL

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

2.5. Tampão de Extração de DNA

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

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

2.6. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

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

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

2.7. Tampão de desnaturação

NaCl 1,5 mol/L
NaOH 0,5 mol/L

As substâncias que compõem a solução foram dissolvidas em água destilada.

2.8. Solução de neutralização

Tris-HCl pH 7,2 0,5 mol/L
NaCl 1,5 mol/L

As substâncias que compõem a solução foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,2. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

2.9. Tampão SSC

NaCl 750mmol/L
Citrato de sódio pH 7,0 75 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas e o tampão foi ajustado para pH 7,5. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

2.10. Tampão de extração plasmídeos

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

2.11. Tampão Tris-EDTA (TE)1X

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

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

2.12. Acetato de Lítio 1X

Acetato de Lítio pH 7,5 100 mmol/L

O reagente foi dissolvido em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.13. Tampão de lise para levedura

EDTA 1 mmol/L

Tampão fosfato pH 7,4 50mmol/L

Glicerol 5% (v/v)

PMSF 1 mmol/L

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

β-mercaptoetanol 100mmol/L

Tris-HCl pH 8,5 10 mmol/L

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

Sorbitol 1,3 mol/L

EDTA 0,5 mmol/L

BSA 0,2% (p/v)

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

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

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

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

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

**2.18. Tampão de ressuspensão mitocondrial para
*S. cerevisiae***

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

2.19. Tampão de amostra 2X concentrado

DTT 100,00mmol/L
Tris-HCl pH 6,8 80,0 mmol/L
Glicerol 15,0% (v/v)
SDS 2,0% (p/v)
Azul de bromofenol 0,006% (p/v)

2.20. Tampão de corrida Tris/Glicina

Tris-HCl pH 8,3	25,00mmol/L
Glicina	250,00mmol/L
SDS	0,1% (p/v)

2.21. Solução corante de *Coomassie Brilliant Blue G*

<i>Coomassie Brilliant Blue G</i>	0,25% (p/v)
Metanol	50,0% (v/v)
Ácido acético	7,0% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	500,00 mL

2.22. Solução descorante

Etanol	5,0% (v/v)
Ácido acético	7,0% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1.000,0 mL

2.23. TBS-T

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

2.24. Tampão de transferência (Western Blotting)

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

2.25. Meio de respiração para *A. fumigatus*

KCl	1,7 mmol/L
MgCl ₂	5,0 mmol/L
EGTA	0,5 mmol/L
KH ₂ PO ₄	10,0 mmol/L
Glucose	2,0% (p/v)
Hepes-KOH pH 7,4	50,0 mmol/L

2.26. Solução 1 (protocolo de esferoplatização *A. fumigatus*)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,8mol/L
Ácido cítrico	0,1mol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.27. Solução 2 (protocolo de esferoplatização

***A. fumigatus*)**

Extrato de levedura 2% (p/v)

Sacarose 2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.28. Solução 3 (protocolo de esferoplatização

***A. fumigatus*)**

(NH₄)₂SO₄ 0,4 mol/L

Ácido cítrico 0,05 mol/L

Sacarose 1,0% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.29. Solução 4 (protocolo de esferoplatização

***A. fumigatus*)**

Polietileno glicol 6000	25% (p/v)
CaCl ₂	100mmol/L
KCl	600mmol/L
Tris-HCl	10 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 7,5 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.30. Solução 5 (protocolo de esferoplatização

***A. fumigatus*)**

CaCl ₂	50 mmol/L
KCl	600 mmol/L
MES	10 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

2.31. Solução GH (Glicose-Hepes)

Glucose 2% (p/v)
Na-HEPES pH 7,2 10 mM

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, e ajustado para pH 7,2, e em seguida esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

Apêndice 3 – Organismos

3.1. *A. fumigatus*

O isolado clínico de *A. fumigatus* foi cedido pela Dra. Cláudia O. Rodrigues da University of Miami, Flórida, e a **CEA17** (*pyrG*) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman da FCFRP-USP.

3.2. *E. coli*

As bactérias *Escherichia coli* das linhagens DH5 α (F- ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deo* *RrecA1* *endA1* *hsdR17* (*rk⁻mk⁺*) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1*) foram utilizadas como receptoras para transformação, clonagem e propagação de plasmídeos.

3.3. *S. cerevisiae*

A cepa de *S. cerevisiae* da linhagem **INVSc1** (Invitrogen) (MAT α *his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52*/ MAT α *his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52*) foi utilizada em experimentos de expressão heteróloga.

Apêndice 4 – Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) .

Figure 3. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Apêndice 5 - Mapa do plasmídeo de expressão em leveduras pYES2[®] (Invitrogen).