UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise dos níveis relativos de transcrição de genes antioxidantes e da cadeia de transporte de elétrons de *Aspergillus fumigatus*

Renata Vilela Rodrigues

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise dos níveis relativos de transcrição de genes antioxidantes e da cadeia de transporte de elétrons de *Aspergillus fumigatus*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Renata Vilela Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 11/01/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

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

Rodrigues, Renata Vilela
Análise dos níveis relativos de transcrição de genes antioxidantes e da cadeia de transporte de elétrons de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2012.
167 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Uyemura, Sergio Akira.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Mitocôndria. 3. Cadeia de transporte de elétrons. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Componentes alternativos mitocondriais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Renata Vilela Rodrigues
Título do trabalho: Análise dos níveis relativos de transcrição de genes antioxidantes e da cadeia de transporte de elétrons de *Aspergillus fumigatus*.

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sergio 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:_____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura, pelo exemplo de profissionalismo, ética e comprometimento com a formação de seus alunos, prezando sempre pela visão humana de sua equipe.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste projeto.

À empresa Eppendorf nas pessoas de Ana Paula Aukar e Luciano Takeshi Kishi que não mediram esforços para a viabilização de parte fundamental deste projeto.

Aos Profs. Drs. César Gonçalves de Lima e Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos USP – Pirassununga, pelo auxílio e orientação com as análises estatísticas.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino e Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pelo apoio e orientação.

À Profa. Dra. Juliana Cândido Silva pela amizade, dedicação e ensinamentos tão importantes para meu aprendizado.

À Fernanda Gomes Cardoso e Silveli Suzuki, com quem conheci a amizade verdadeira e aprendi a ser mais humana.

Aos queridos amigos Ana Carolina Alvarenga, Emerson de Souza Santos, Hamilton Luis Gimenes Teixeira e Laís L. L. Bálico, todo meu respeito e gratidão pela troca de experiências, convivência e amizade valiosa.

Aos colegas Anna Carolina de Freitas Policarpo, Cibele Cesila, Cristiana Bernadelli Garcia, Erika Nascimento, Everaldo dos Reis Marques, Fernando Segato, Frederico Marianetti Soriani, Henrique César Santejo Silveira, Kátia Kaori Otaguiri, Ludmila Tonani e Taísa Magnani Dinamarco pela ajuda em diversas fases da realização deste projeto.

Agradeço coletivamente à equipe de trabalho do laboratório da Profa. Andréia por tornar agradável nosso ambiente de trabalho.

Aos técnicos Antônio Zanardo Filho, João José Franco e Nancy Rodrigues pelo auxílio técnico e companheirismo.

À minha segunda família (Sandra, Agnaldo, Thiago, Rebecca, Sara e Tamara) pelos apoios moral e afetivo.

À minha família, Osvaldo, Isoldina e Jonathas, comigo *ad praeterea vitam.*

"The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living."

Henri Poincaré

RESUMO

RODRIGUES, R. V. **Análise dos níveis relativos de transcrição de genes antioxidantes e da cadeia de transporte de elétrons de *Aspergillus fumigatus***. 2012. 167f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Aspergillus fumigatus é um fungo oportunista, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes imunossuprimidos, acometidos com aspergilose invasiva. O sistema de defesa antioxidante do fungo atua como fator primordial de sua patogenicidade, mitigando os efeitos deletérios de espécies reativas produzidas pelo hospedeiro. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o nível de transcrição relativo dos genes associados às proteínas mitocondriais e antioxidantes na presença de diferentes agentes pró-oxidantes para hifas e germinantes de cepas controle (CEA17) e nocaute para oxidase alternativa (Δ*aoxA*) de *A. fumigatus.* Utilizando qPCR, foram analisados 23 genes para as cepas CEA17 e mutante, dentre os quais, 5 associados à cadeia de transporte de elétrons (CTE), 4 relacionados aos componentes alternativos mitocondriais e 14 associados às proteínas antioxidantes. Os resultados foram obtidos através da normalização com o gene constitutivo *gapdh* utilizando a cepa CEA17 sem tratamento de cada fase de desenvolvimento celular como calibrador. As diferenças de transcrição da maioria dos genes estudados variaram com o pró-oxidante utilizado e com a fase de desenvolvimento celular (germinantes e hifas). A CTE em germinantes apresentou maiores níveis de transcritos dos *complexos II* e *III* em CEA17 do que em Δ*aoxA* tratadas com menadiona. Com os demais complexos e *atpase* não foram observadas diferenças significativas quando comparados os resultados de ambas as cepas. Entretanto, os níveis de transcritos de *atpase* não foram superiores ao controle em nenhuma das cepas, sugerindo sua regulação na presença de *ucp*. *ucp-like* teve seus níveis de transcritos aumentados no mutante, sugerindo o desacoplamento da CTE em relação ao controle e à CEA17, que apresentou alto nível de transcritos de *nde*. Nesta cepa, os níveis de *aoxA* e *ucp* não foram significativamente diferentes. Esse fato, associado a níveis menores de *ndiA* e transcritos dos *complexos I* e *II*, sugerem manutenção do fluxo de elétrons na mitocôndria. Em relação às enzimas antioxidantes, houve aumento significativo nos níveis de *cat2*, *catA*, *prx1*, *trx1* e *grx1*, indicando provável resposta à ausência de AOX. Os transcritos relacionados à CTE em hifas não apresentou diferença significativa nos níveis de *complexo III* e *atpase* em CEA17 e Δ*aoxA*. No entanto, *complexo IV* se mostrou superior no mutante. Nesta fase de desenvolvimento, o aumento dos níveis de *ucp-like* está relacionado ao tratamento com menadiona e não com a presença de *aoxA*, explicando os mesmos níveis de transcritos em CEA17 e Δ*aoxA*. Os níveis de *nde* sugerem atividade coordenada de sua proteína com AOX, por seus níveis estarem modulados pela presença de *aoxA*. A participação da Nde e da AOX na detoxificação das espécies reativas de oxigênio é sugerida ao se obter altos níveis de seus transcritos em hifas tratadas com menadiona. Diferentemente de germinantes, transcritos de *sod*3 foram predominantes em hifas de CEA17, enquanto transcritos de *sod2* foram maiores em Δ*aoxA*. Entre as catalases, os níveis de *catA* foram maiores no mutante, bem como a atividade das catalases como um todo. *prx1* e *trx1* foram maiores em CEA17 e

grx1 em Δ*aoxA*. Porém, *trx1* atingiu os mais altos níveis de transcritos em germinantes, indicando possível redução de proteínas tiólicas e ribonucleotídeos por diferentes vias, de acordo com a fase de desenvolvimento do fungo. As enzimas antioxidantes clássicas, como superóxido dismutase, catalase e enzimas tiólicas, apresentaram aumento de transcrição na maioria das condições estudadas. No entanto, menadiona e paraquat promoveram maiores variações nos transcritos do que o observado com peróxido de hidrogênio gerado pelo sistema glicose/glicose oxidase.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Mitocôndria. 3. Cadeia de transporte de elétrons. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Componentes alternativos mitocondriais

ABSTRACT

RODRIGUES, R. V. **Transcription relative levels analysis of *Aspergillus fumigatus* antioxidant and electrons transport chain genes**. 2012. 167f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Aspergillus fumigatus is an opportunistic fungus which has been referred to as a major cause of morbidity and mortality in imunosupressed patients affected with invasive aspergillosis. The antioxidant defense system of the fungus plays an important role in its pathogenicity by overcoming the negative effects of the oxygen reactive species produced by host. This work aims evaluating the transcription of genes associated to mitochondrial and antioxidant proteins in the presence of different prooxidants for hyphae and germinants of control (CEA17) and alternative oxidase knockout (Δ*aoxA*) strains. Using qPCR, 23 genes have been analyzed, 5 of which are electron transport chain (ETC), 4 are related to alternative components of the mitochondria, and 14 are associated to antioxidant proteins. The results were obtained via normalization with the constitutive gene *gapdh* using untreated CEA17 strain in each developmental phase as calibrator. The differences in the transcription of most analyzed genes varied with the prooxidant and the developmental phase (germinants and hyphae). The ETC in germinants presented higher amounts of transcripts of the complex II and III in CEA17 than in Δ*aoxA* treated with menadione. With other complexes and the *atpase* no significant difference has been noted between both strains. However, the transcript levels of ATP synthase were not higher than control in any strain, which is related to its regulation in the presence of UCP. UCP-like had increased transcription in mutant, suggesting uncoupling from the ETC, relative to control and CEA17, which showed high levels of *nde*. In this strain, *aoxA* and *ucp*-like transcripts were not significantly different. This fact associated the lower levels of *ndiA* and transcripts of the *complexes I* and *II* suggest the maintenance of the electron flow in the mitochondria. Concerning the antioxidant enzymes, there was significant increase in the transcript production of *cat2*, *catA*, *prx1*, *Ttrx1* and *Ggrx1*, suggesting a response to the absence of AOX. The ETC transcripts in hyphae did not present significant difference in the levels of *complex III* and *atpase* in CEA17 and Δ*aoxA*. Yet the *complex IV* has shown higher in mutant than in CEA17. In this developmental phase, the increase of *ucp*-like is related to the treatment with menadione and not with the presence of *aoxA*, what explains the equivalent amount of transcripts in CEA17 and Δ*aoxA*. The levels of *nde* suggest coordinated action of the protein with AOX, because it is modulated by the presence of *aoxA*. The role of Nde and AOX in the detoxification of reactive oxygen species is suggested by their high levels of transcripts in hyphae treated with menadione. Different from germinants, transcripts of *sod3* was predominant in CEA17 hyphae, whereas transcripts of *sod2* were higher for Δ*aoxA*. Among catalases, levels of *catA* were higher in mutant, as was the activity of catalase as a whole. *prx1* and *trx1* transcripts were higher in CEA17 and *grx1* in Δ*aoxA*. Yet, *trx1* reached the highest levels of transcripts in germinants, indicating a possible reduction of thiol proteins and ribonucleotides through different ways, according to the developmental phase of the fungus. The classical antioxidant enzymes, as superoxide dismutase, catalase and thiol enzymes showed increase in the transcripts in most of the analyzed situations.

However, menadione and paraquat promoted higher variation in the transcripts than that observed with hydrogen peroxide generated by the system glucose/glucose oxidase.

Keywords: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Mitochondrion. 3. Electrons transport chain. 4. Antioxidant enzymes. 5. Mitochondrial alternative compounds.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Cadeia de transporte de elétrons, representada com enzimas alternativas 10

Figura 2 - Fluxograma da ação das enzimas antioxidantes de *A. fumigatus* ... 16

Figura 3 - Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE dos fragmentos dos produtos obtidos com oligonucleotídeos para os genes *pyrG* e *aoxA* de *A. fumigatus* cepa CEA17 e mutante AoxA 43

Figura 4 - Viabilidade celular de *A. fumigatus* CEA17 na presença de pró-oxidantes 46

Figura 5 - Viabilidade celular de *A. fumigatus* Δ*aoxA* na presença de pró-oxidantes 47

Figura 6 - Níveis de transcrição de *c I* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes..... 48

Figura 7 - Níveis de transcrição de *sdh1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 50

Figura 8 - Níveis de transcrição de *c III* em germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 51

Figura 9 - Níveis de transcrição de *c III* em hifas de *A. fumigatus* de acordo com a exposição aos diferentes agentes pró-oxidantes (a) e as cepas (b) 52

Figura 10 - Níveis de transcrição de *c IV* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigat*us cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes..... 54

Pág.

Figura 11 - Níveis de transcrição de *atpase* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes..... 55

Figura 12 - Níveis de transcrição de *ndiA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 57

Figura 13 - Níveis de transcrição de *nde* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 59

Figura 14 - Níveis de transcrição de *aoxA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepa CEA17, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 60

Figura 15 - Níveis de transcrição de *ucp* em germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos a diferentes agentes pró-oxidantes 61

Figura 16 - Níveis de transcrição de *ucp* em hifas de *A. fumigatus*, expostas aos diferentes agentes pró-oxidantes 62

Figura 17 - Níveis de transcrição de *sod1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 64

Figura 18 - Níveis de transcrição de *sod2* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 65

Figura 19 - Níveis de transcrição de *sod3* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 67

Pág.

Figura 20 - Níveis de transcrição de *Cu,Znsod* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 68

Figura 21 - Níveis de transcrição de *cat1* em germinantes de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 69

Figura 22 - Níveis de transcrição de *cat1* em hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes .. 70

Figura 23 - Níveis de transcrição de *cat2* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 72

Figura 24 - Níveis de transcrição de *catA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 74

Figura 25 - Níveis de transcrição de *ccp1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 75

Figura 26 - Níveis de transcrição de *prx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 77

Figura 27 - Níveis de transcrição de *trx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 78

Figura 28 - Níveis de transcrição de *grx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 80

Figura 29 - Níveis de transcrição de *glr1*, em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 81

Pág.

Figura 30 - Níveis de transcrição de *idh*, em germinantes de *A. fumigatus* de acordo com a exposição aos diferentes agentes pró-oxidantes (a) e as cepas (b) 83

Figura 31 - Níveis de transcrição de *idh* em hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes .. 84

Figura 32 - Níveis de transcrição de *rci* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes 85

Figura 33 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à menadiona 87

Figura 34 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos ao paraquat 88

Figura 35 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à GO 89

Figura 36 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas à menadiona 90

Figura 37 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas ao paraquat 91

Figura 38 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas à GO 92

Figura 39 - Perfil do consumo de oxigênio de *A. fumigatus* CEA17 sob a ação de inibidores 93

Figura 40 - Atividade específica de Cat em germinantes e hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à menadiona 95

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real 33

Tabela 2 - Diluições do DNA genômico para a construção da curva de calibração dos oligonucleotídeos 36

Tabela 3 - Níveis médios de transcrição de *c I* em germinantes e hifas, por tratamento 48

Tabela 4 - Níveis médios de transcrição de *sdh1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 49

Tabela 5 - Níveis médios de transcrição de *c III* em germinantes, por tratamento e por cepa 51

Tabela 6 - Níveis médios de transcrição de *c III* em hifas, por tratamento 52

Tabela 7 - Níveis médios de transcrição de *c III* em hifas, por cepa 52

Tabela 8 - Níveis médios de transcrição de *c IV* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa ...……..... 53

Tabela 9 - Níveis médios de transcrição de *atpase* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 55

Tabela 10 - Níveis médios de transcrição de *ndiA* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 56

Tabela 11 - Níveis médios de transcrição de *nde* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 58

Tabela 12 - Níveis médios de transcrição de *aoxA* em germinantes e hifas, por tratamento 60

Tabela 13 - Níveis médios de transcrição de *ucp* em germinantes, por tratamento e por cepa 61

Pág.

Tabela 14 - Níveis médios de transcrição de *ucp* em hifas, por tratamento 62

Tabela 15 - Níveis médios de transcrição de *sod1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 63

Tabela 16 - Níveis médios de transcrição de *sod2* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 65

Tabela 17 - Níveis médios de transcrição de *sod3* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 66

Tabela 18 - Níveis médios de transcrição de *Cu,Znsod* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 68

Tabela 19 - Níveis médios de transcrição de *cat1* em germinantes, por tratamento 69

Tabela 20 - Níveis médios de transcrição de *cat1* em hifas, por tratamento e por cepa 70

Tabela 21 - Níveis médios de transcrição de *cat2* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 71

Tabela 22 - Níveis médios de transcrição de *catA* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 73

Tabela 23 - Níveis médios de transcrição de *ccp1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 74

Tabela 24 - Níveis médios de transcrição de *prx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 76

Tabela 25 - Níveis médios de transcrição de *trx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 78

Tabela 26 - Níveis médios de transcrição de *grx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 79

Pág.

Tabela 27 - Níveis médios de transcrição de *glr1* em germinantes e hifas, por tratamento 81

Tabela 28 - Níveis médios de transcrição de *idh* em germinantes, por tratamento 82

Tabela 29 - Níveis médios de transcrição de *idh* em germinantes, por cepa ... 82

Tabela 30 - Níveis médios de transcrição de *idh* em hifas, por tratamento e por cepa 83

Tabela 31 - Níveis médios de transcrição de *rci* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa 85

Tabela 32 - Atividade específica de Cat em germinantes, por tratamento 94

Tabela 33 - Atividade específica de Cat em hifas, por tratamento e por cepa . 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aoxA/AOX	Oxidase alternativa (gene / proteína)
Atpase/ATPase	ATP sintetase (gene / proteína)
Ca^{2+}	Íon cálcio
Cat	Catalase
cat1/Cat1	Catalase micelial (gene / proteína)
cat2/Cat2	Catalase-peroxidase bifuncional micelial (gene / proteína)
catA/CatA	Catalase esporo-específica (gene / proteína)
ccp1/Ccp1	Citocromo C peroxidase (gene / proteína)
cDNA	DNA complementar
c I/complexo I	NADH desidrogenase (gene / proteína)
c *III*/complexo III	Citocromo C redutase (gene / proteína)
c IV/complexo IV	Citocromo C oxidase (gene / proteína)
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
Cu,Znsod/Cu,ZnSod	Superóxido dismutase cobre-zinco citoplasmática (gene / proteína)
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
fg	Fentograma
FSC	*Forward Scatter*
gapdh/GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gene / proteína)
GO	Glicose oxidase
grx1/Grx1/ $GRX(SH)_2$	Glutarredoxina (gene / proteína)
GSH	Glutationa (proteína)
glr1/Glr1	Glutationa redutase (gene / proteína)
GSHp	Glutationa peroxidase (proteína)
H^+	Próton

H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDQ	1-hidroxi-2-dodecil-4(1H)quinolona
HRP	*Horseradish peroxidase*
idh/Idh	Isocitrato desidrogenase (gene / proteína)
KCl	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
Mb	Megabase
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MnSod	Superóxido dismutase manganês (proteína)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NDH	NADH desidrogenase alternativa (proteína)
nde/Nde	NADH desidrogenase alternativa externa (gene / proteína)
ndiA/NdiA	NADH desidrogenase alternativa interna (gene / proteína)
NNT	Nicotinamida nucleotídeo transidrogenase
NO	Óxido nítrico
$O_2^{\bullet -}$	Ânion superóxido
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxil
$OONO^-$	Peroxinitrito
ORF	*Open reading frame*
PBS	Tampão salina fosfato
PI	Iodeto de propídio
PIC	Coquetel inibidor de protease
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
prx1/Prx1	Peroxirredoxina (gene / proteína)
Ptn	Proteína
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
R^2	Coeficiente de determinação
rci/RCI	Peptídeo de resposta ao estresse (gene / proteína)

RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa
sdh1 / complexo II	Succinato desidrogenase – complexo II (gene / proteína)
SHAM	Ácido salicil-hidroxâmico
sod1/Sod1	Superóxido dismutase cobre-zinco citoplasmática (gene / proteína)
sod2/Sod2	Superóxido dismutase manganês mitocondrial (gene / proteína)
sod3/Sod3	Superóxido dismutase manganês citoplasmática (gene / proteína)
SSC	*Side Scatter*
trx1/Trx1	Tiorredoxina (gene / proteína)
ucp/UCP	Proteína desacopladora (gene / proteína)
UQ	Ubiquinona
WST-1	(2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)- 2H-tetrazólio, sal monosódico)

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT iii
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xii

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 *Aspergillus fumigatus* 2
1.2 Características macro e microscópicas 3
1.3 Patogênese 3
1.4 Função mitocondrial 7
1.5 Componentes alternativos 9
1.6 A formação de EROs na mitocôndria 14
1.7 Sistemas antioxidantes 15
1.8 Oxidase alternativa (AOX) como sistema antioxidante 18
1.9 PCR em tempo real 20

2. OBJETIVOS 23
2.1 Objetivo 24
2.2 Planejamento 24

3. METODOLOGIA 25
3.1 Cultura celular 26
3.2 Isolamento de DNA genômico (DNAg) 26
3.2.1 Reações em cadeia da polimerase (PCR) 27
3.2.2 Eletroforese em gel de agarose 28
3.3 Uso de glicose oxidase para formação de peróxido de hidrogênio em meio de cultura 28
3.3.1 Avaliação do consumo de glicose pela glicose oxidase 29
3.3.2 Avaliação do pH da cultura durante a atividade da glicose oxidase 29

3.3.3 Avaliação da formação de peróxido de hidrogênio por glicose oxidase e sua degradação por *A. fumigatus* 30
3.4 Exposição de *A. fumigatus* aos agentes pró-oxidantes 30
3.5 Viabilidade de germinantes de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* por citometria de fluxo 31
3.6 Extração de RNA 31
3.7 Desenho de oligonucleotídeos para PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 32
3.8 Uso de qPCR para a avaliação de genes diferentemente transcritos em *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* expostos a diferentes pró-oxidantes 34
3.8.1 RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa) 34
3.8.2 Reação de qPCR 35
3.9 Determinação da atividade enzimática de oxidase alternativa e catalase em *A. fumigatus* exposto à menadiona 37
3.9.1 Exposição de *A. fumigatus* à menadiona 37
3.9.2 Influência de AOX na velocidade de consumo de oxigênio 38
3.9.3 Obtenção de extrato proteico total 38
3.9.4 Atividade de catalase 39
3.10 Análises estatísticas 40

4. RESULTADOS 42
4.1 Verificação da deleção do gene da oxidase alternativa em mutante de *A. fumigatus* 43
4.2 Viabilidade de germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA* na presença de pró-oxidantes 44
4.3 Avaliação de genes diferencialmente transcritos em germinantes e hifas de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* após a exposição a diferentes agentes pró-oxidantes 46
4.3.1 Componentes da Cadeia Respiratória 47
4.3.1.1 NADH desidrogenase (Complexo I - *c I*) 47
4.3.1.2 Succinato desidrogenase (Complexo II - *sdh1*) 49
4.3.1.3 Citocromo C redutase (Complexo III - *c III*) 50
4.3.1.4 Citocromo C oxidase (Complexo IV - *c IV*) 53

4.3.1.5 ATP sintetase (*atpase*) 54
4.3.2 Componentes alternativos mitocondriais 56
4.3.2.1 NADH desidrogenase alternativa interna (*ndiA*) 56
4.3.2.2 NADH desidrogenase alternativa externa (*nde*) 57
4.3.2.3 Oxidase Alternativa (*aoxA*) 59
4.3.2.4 Proteína UCP-*like* (*ucp*) 60
4.3.3 Componentes do sistema antioxidante 62
4.3.3.1 Superóxido dismutase 1 (*sod1*) 62
4.3.3.2 Superóxido dismutase 2 (*sod*2) 64
4.3.3.3 Superóxido dismutase 3 (*sod*3) 65
4.3.3.4 Superóxido dismutase Cu,Zn (*Cu,Znsod*) 67
4.3.3.5 Catalase micelial (*cat*1) 68
4.3.3.6 Catalase peroxidase bifuncional (*cat2*) 71
4.3.3.7 Catalase esporo-específica (*catA*) 72
4.3.3.8 Citocromo C peroxidase (*ccp1*) 74
4.3.3.9 Peroxirredoxina (*prx1*) 76
4.3.3.10 Tiorredoxina (*trx1*) 77
4.3.3.11 Glutarredoxina (*grx1*) 79
4.3.3.12 Glutationa redutase (*glr1*) 80
4.3.3.13 Isocitrato desidrogenase (*idh*) 82
4.3.3.14 Peptídeo RCI (*rci*) 84
4.3.4 Níveis de transcrição em germinantes e hifas de *A. fumigatus* agrupados de acordo com suas funções e o pró-oxidante utilizado 86
4.4 Avaliação da influência de AOX na velocidade de consumo de oxigênio em hifas de *A. fumigatus* CEA17 após exposição à menadiona 93
4.5 Avaliação da atividade de catalase (Cat) em germinantes e hifas de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* após a exposição à menadiona 94

5. DISCUSSÃO 96
5.1 Enzimas da cadeia de transporte de elétrons 98
5.2 Componentes alternativos mitocondriais 100
5.3 Enzimas antioxidantes 102

6. CONCLUSÕES 111

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

APÊNDICES 130
1 - Soluções, tampões e meios de cultivo 131
1.1 Solução de elementos traços 131
1.2 Salina fosfato tamponada (PBS/Tween 20) 131
1.3 Solução dextrose-hepes 132
1.4 Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS) 10X 132
1.5 Tampão de amostra (para RNA) 133
1.6 Solução desnaturante para amostra de RNA 133
1.7 Tampão de extração de proteína 134
1.8 Meio de cultivo YG 134
2 - Padronização do uso de glicose oxidase para formação de peróxido de hidrogênio em meio de cultura 135
2.1 Avaliação do consumo de glicose pela glicose oxidase 136
2.2 Avaliação do pH da cultura durante a atividade da glicose oxidase 137
2.3 Avaliação da degradação do peróxido de hidrogênio por *A. fumigatus* durante a atividade da glicose oxidase 138
3 - Padronização da concentração de sonda FUN®1 140
4 - Histogramas das análises de citometria de fluxo de *A. fumigatus* 142
4.1 *A. fumigatus* CEA17 142
4.2 *A. fumigatus* Δ*aoxA* 143

1. Introdução

1. Introdução

Nas duas últimas décadas, infecções oportunistas causadas por fungos têm sido frequentemente diagnosticadas em pacientes imunocomprometidos, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes hospitalizados em todo o mundo. Como as consequências dessas infecções estão intimamente ligadas às condições imunes dos pacientes, o rápido aumento de casos de AIDS e de transplantes de órgãos e o desenvolvimento de terapias imunossupressoras mais efetivas levaram ao aumento drástico de suas incidências, sendo a candidíase a principal infecção oportunista (WANKE; LAZERA; NUCCI, 2000; BADIEE; ALBORZI, 2011). No entanto, novas espécies de fungos são regularmente identificadas como causadoras de doenças nesses pacientes. Dentre os patógenos emergentes é um importante causador de micoses sistêmicas o fungo *Aspergillus fumigatus*, representando a segunda espécie mais notificada em pacientes imunossuprimidos por transplantes de medula óssea ou de órgãos (WANKE; LAZERA; NUCCI, 2000).

1.1 *Aspergillus fumigatus*

Nos últimos anos, o fungo *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 o fungo sobrevive e cresce em vegetais em decomposição; portanto, áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (BRAKHAGE; LANGFELDER, 2002; DENNING, 1998). Entretanto, conídios deste fungo podem ser encontrados praticamente em todos os lugares, sendo importante fator de infecção hospitalar (WANKE; LAZERA; NUCCI, 2000).

O conhecimento de sua biologia e o esclarecimento de sua sequência genômica (NIERMAN et al, 2005) está auxiliando na elucidação dos mecanismos de patogenicidade deste fungo.

1.2 Características macro e microscópicas

As colônias do *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona a 37°C. Nestas condições, as colônias possuem coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios. A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas; as cabeças conidiais apresentam ao microscópio óptico, aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides uniseriadas, recobrindo 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 termorresistente e pode sobreviver em temperaturas superiores a 55°C, sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies (HAINES, 1995).

1.3 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 portadores de polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune inato, ou aqueles submetidos a terapias

imunossupressoras (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; CAMPS, 2008; ITO; LYONS, 2002; OK; EINSELE; LOEFFLER, 2011).

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) quase que exclusivamente em pacientes imunocomprometidos (BRAKHAGE, 2005). Em estudos estatísticos realizados entre os anos de 2001 e 2002 nos Estados Unidos, pacientes submetidos aos transplantes de órgãos e células-tronco hematopoiéticas acometidos pelo gênero *Aspergillus*, foram infectados por *A. fumigatus* na porcentagem de 76,4% e 56%, respectivamente (MORGAN et al, 2005). Este sucesso está relacionado ao diminuto tamanho de seu esporo, à termorresistência particular, que lhe permite enfrentar diferentes condições de estresse, à presença de inúmeras moléculas relacionadas à toxicidade, defesa antioxidante, captação de nutrientes e sua interação com o hospedeiro, bem como às eficientes regulação metabólica e sinalização celular (ABAD et al, 2010; MCCORMICK; LOEFFLER; EBEL, 2010).

Atualmente, a eficiente capacidade infectiva de *A. fumigatus* também está sendo relacionada a diversos fatores de virulência específicos da espécie (HORN et al, 2012), como o gene *pksP*, responsável pela biossíntese de diidroxinaftaleno-melanina, o pigmento verde-acinzentado do conídio (LANGFELDER et al, 1998; VOLLING et al, 2011) e os fatores de transcrição SrbA, responsável pela adaptação da espécie em condições de hipóxia (WILLGER, 2008), e SebA, associado à diferentes vias de resposta ao estresse e ao crescimento em meios pobres em

nutrientes (DINAMARCO et al, 2012). A capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro através da ligação dos conídios aos reguladores do sistema complemento humano (BEHNSEN et al, 2008; 2010) também é considerada fator importante para a sua virulência.

Na maioria dos pacientes, a principal forma de infecção do *A. fumigatus* ocorre por inalação de conídios, afetando desta forma, principalmente o trato respiratório. No entanto, outros locais de infecção como pele, peritônio, ossos e olhos, dentre outros, têm sido descritos em pacientes sadios e imunocomprometidos (DENNING, 1998; PITT, 1994).

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. Por outro lado, 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, trato gastrointestinal e os rins, sendo a forma disseminada geralmente aguda e fatal.

Atualmente não há testes diagnósticos confiáveis para a aspergilose invasiva. O seu tratamento, assim como de outras micoses, também é restrito a um número limitado de drogas e dentre elas os azóis e anfotericina B, que representam as principais drogas utilizadas nestas infecções (LATGÉ; CALDERONE, 2002). O

voriconazol é o agente de primeira linha para o tratamento da aspergilose invasiva, sendo sua eficácia superior à da anfotericina B no início da terapia, além de apresentar menor incidência de efeitos adversos (HERBRECHT et al, 2002; WALSH et al, 2008). A caspofungina e micafungina, fármacos da classe das equinocandinas, estão sendo utilizadas como alternativas para a terapia de recuperação, uma vez que seu papel no tratamento primário da patologia ainda é pouco esclarecido (DENNING, 2003; DENNING; HOPE, 2010; KARTSONIS; NIELSEN; DOUGLAS, 2003; NAGASAKI et al, 2009). Apesar dos grandes avanços na terapêutica, a resistência clínica e microbiológica ainda são dificuldades a serem solucionadas. É crescente o número de infecções por *Aspergillus* resistentes a azóis. Nos Estados Unidos, 52% dos isolados identificados entre 2002 e 2009 foram classificados como resistentes, contra apenas 10% entre 1987 e 2001 (MARTINEZ et al, 2010 apud ALANIO; CORDONNIER; BRETAGNE, 2011). Aparentemente essa resistência está ligada à exposição prévia do paciente com doença pulmonar crônica ao itraconazol, sendo esta explicada pela farmacocinética e farmacodinâmica do próprio composto (ALANIO; CORDONNIER; BRETAGNE, 2011).

Existem vacinas sendo testadas, porém, a dificuldade em se desenvolver produtos eficazes se baseia no entendimento ainda limitado da resposta imune do hospedeiro e de sua interação com o patógeno, bem como da frequente presença de alergia nos casos de aspergilose (CASSONE, 2008). As imunoterapias baseadas em anticorpos protetores para casos de aspergilose também são tratamentos atualmente investigados (CHATURVEDI et al, 2005), principalmente em associação com antifúngicos para maximizar o efeito destes últimos (OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2010; ROMANI, 2011).

MARTINEZ, M. et al Itraconazole and amphotericin B resistance 1987–2009 in clinical *Aspergillus fumigatus* in northern California [poster #40]. Apresentado em 4th Advances Against Aspergillosis. Roma,Itália: 4-6 fev., 2010.

Com o desenvolvimento das técnicas em biotecnologia e biologia molecular, o futuro das pesquisas em estratégias terapêuticas está baseado no entendimento da interação patógeno-hospedeiro em nível molecular, sendo possível a busca por biomarcadores e alvos terapêuticos específicos (HORN et al, 2012). Para *A. fumigatus* já se encontram disponíveis muitas informações sobre seus genoma e proteoma, sendo necessária sua integração para maior entendimento do sistema biológico e da patogênese (RIZZETTO; CAVALIERI, 2011).

1.4 Função mitocondrial

Presente na maioria dos eucariotos, a mitocôndria se constitui em potencial alvo quimioterápico por ser responsável por diversos processos fundamentais para a manutenção celular. Dentre eles destacam-se a geração e regulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), a apoptose, a homeostase de cálcio, o metabolismo de nucleotídeos, lipídios, ferro e aminoácidos e a fosforilação oxidativa (PAGLIARINI; DIXON, 2006; MARTINS et al, 2011).

A mitocôndria é a organela celular responsável 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 fosforilação oxidativa presente nas mitocôndrias e dependente dos substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons (Δp), cujo potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) é de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e cuja diferença de pH (ΔpH) é de uma unidade (alcalino na matriz). Em mamíferos, o sistema responsável pela fosforilação oxidativa na membrana interna da

mitocôndria, é formado por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia respiratória (complexos I-IV) e a FoF1-ATP sintetase (complexo V). Durante a fosforilação oxidativa os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis pela ação de desidrogenases específicas, ligadas a NAD^+ (substratos de sítio I), e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. Os equivalentes redutores são transferidos inicialmente a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). Em uma via alternativa, o succinato (substrato de sítio II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem os seus elétrons a ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos sequencialmente aos complexos III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água. Os elétrons originados na beta oxidação dos ácidos graxos são transferidos à cadeia respiratória através da ubiquinona (BOYER et al, 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

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 é acompanhado 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 sintetase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (BOYER; CROSS; MOMSEN, 1973; MITCHELL, 1961).

A interação entre os complexos I, III e IV, formando supercomplexos, foi sugerida para os ascomicetos *Neurospora crassa* (MARQUES et al, 2007) e *Podospora anserina* (KRAUSE et al, 2004). Na mitocôndria de *P. anserina* também foi observada a participação de enzimas alternativas na estabilização do complexo I

e na conservação filogenética do mesmo quando da falta dos complexos III e IV (MAAS et al, 2009).

Estudos recentes sobre a mitocôndria de fungos revelaram o importante papel da mitocôndria na resistência às drogas atualmente utilizadas, sendo que mudanças na função mitocondrial podem levar à maior ou menor resistência. A presença de componentes alternativos mitocondriais na cadeia de transporte de elétrons desses microrganismos pode estar relacionada a essas adaptações, como sugerem trabalhos com mutantes mitocondriais em modelos de infecção animal (SHINGU-VAZQUEZ; TRAVEN, 2011).

A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, demonstrando a presença de complexos I-V, e sugerindo a presença de uma NADH-desidrogenase alternativa, de uma proteína desacopladora e de uma oxidase alternativa mitocondrial (TUDELLA et al, 2004).

1.5 Componentes alternativos

Uma importante característica na mitocôndria de plantas (KERSCHER, 2000; RASMUSSON et al, 1999), fungos (de VRIES; GRIVELL, 1988; MELO et al, 2001), eubactérias (BJÖRKLÖF; ZICKERMANN; FINEL, 2000; MATSUSHITA; OHNISHI; KABACK, 1987), arqueobactérias (BANDEIRAS et al, 2003; GOMES; BANDEIRAS; TEIXEIRA, 2001) e parasitas (BIAGINI et al, 2006) é a presença de enzimas alternativas, como a proteína desacopladora (UCP), a oxidase alternativa (AOX) e a NADH desidrogenase alternativa (NDH) em suas cadeias respiratórias (Figura 1). Estudos sugerem que eles estão envolvidos na adaptação destes organismos em ambientes instáveis, como estresse ao frio, estresse oxidativo,

condições anaeróbias e variações de temperatura (AMOR; CHEVION; LEVINE, 2000; CALEGARIO et al, 2003).

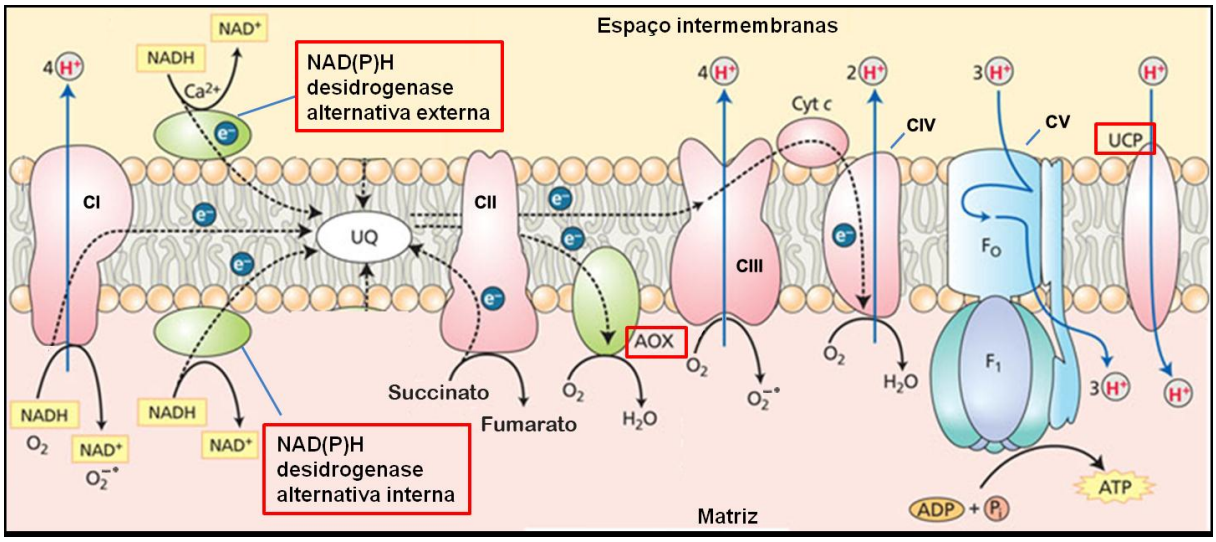


Figura 1 – Cadeia de transporte de elétrons, representada com enzimas alternativas. **CI**: complexo I; **CII**: complexo II; **CIII**: complexo III; **CIV**: complexo IV; **CV**: ATP sintetase; **UQ**: ubiquinona; **CytC**: citocromo c; **H^+**: próton; **e^-**: elétron (adaptado de RASSMUSSON; MØLLER, 2006).

A NDH consiste de uma cadeia polipeptídica, sem domínio transmembrana evidente e contém uma molécula de FAD (co-fator de redução), tornando-a capaz de realizar reações de óxido-redução, assim como o complexo I mitocondrial. Entretanto, diferentemente deste complexo enzimático, a NDH não contribui para o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, pode competir com o complexo I pelos substratos NADH e ubiquinona na matriz mitocondrial (de VRIES; MARRES, 1987; YAGI, 1991; O'DONNELL; HARVEY; MCNEIL, 2011) e é insensível aos inibidores clássicos do complexo I, como rotenona e piericidina A (KERSCHER, 2000). Porém, esta enzima pode ser inibida por alguns compostos, incluindo os flavonóides (OETTMEIER et al, 1994) e o 1-hidroxi-2-dodecil-4(1H)quinolona (HDQ) (ESCHEMANN et al, 2005).

A NDH pode estar voltada para a matriz mitocondrial (NADH desidrogenases alternativas internas - Ndi) ou para espaço intermembrana (NADH desidrogenases alternativas externas - Nde) (JOSEPH-HORNE; HOLLOMON; WOOD, 2001; KERSCHER, 2000). Sua atividade foi observada pela primeira vez por Bonner e Voss (1961), os quais demonstraram que a mitocôndria de plantas, ao contrário de mamíferos, era capaz de oxidar o NADH externamente. Sabe-se também que, a Ndi, em conjunto com a AOX, é capaz de restabelecer o fluxo de elétrons e prevenir a redução excessiva das enzimas da cadeia respiratória, prevenindo assim, o excesso de produção de superóxidos na mitocôndria (RASMUSSON; FERNIE; VAN DONGEN, 2009; RUSTIN; JACOBS, 2009).

A mitocôndria de todos os eucariotos conhecidos possui o citocromo *c* oxidase (complexo IV), 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, como algas (TISCHNER; PLANCHET; KAISER, 2004), leveduras (VEIGA; ARRABAÇA; LOUREIRO-DIAS, 2003), protozoários (SUZUKI et al, 2005) e microsporídeos (WILLIAMS et al, 2010) contêm uma segunda oxidase, a AOX, que também catalisa a redução de quatro elétrons do oxigênio para a água. O fluxo de elétrons desta via alternativa ramifica-se da via de transferência de elétrons convencional (frequentemente referida como via do citocromo) através da ubiquinona (SIEDOW; UMBACH, 2000). A transferência de elétrons através da AOX não está acoplada ao bombeamento de prótons. Desta forma, dois dos três sítios de conservação de energia são desviados; porém, o consumo de oxigênio é mantido e a energia livre liberada é dissipada como calor (ALBURY; ELLIOTT; MOORE, 2009). A AOX 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; SIEDOW, 1991; SIEDOW; UMBACH, 1995).

Quanto à função da AOX, sugere-se que ela está diretamente relacionada à diminuição de espécies reativas de oxigênio geradas na mitocôndria (WAGNER; MOORE, 1997), uma vez que o aumento de sua expressão foi verificado em vários organismos, incluindo *A. fumigatus* (MAGNANI et al, 2007). Ela também está envolvida com a manutenção celular em presença de deficiência na cadeia de transporte de elétrons (CHAE; NARGANG, 2009). Em *P. anserina*, a inativação de genes essenciais para a atividade dos complexos III e IV promoveu a expressão constitutiva da AOX e o aumento da expressão de genes relacionados à gliconeogênese, gerando um aumento no tempo de vida do fungo (SELLEM et al, 2009).

Em plantas, como as mitocôndrias estão diretamente ligadas à sinalização de estresse, a AOX participa na regulação da intensidade da resposta dessa via de sinalização, controlando a indução de genes relacionados ao estresse e o tipo de resposta gerada (VANLERBERGHE; CVETKOVSKAA; WANGA, 2009). Ela também está envolvida com a otimização do metabolismo quanto ao consumo de carboidratos e ao transporte de elétrons (VANLERBERGHE; CVETKOVSKAA; WANGA, 2009), influenciando indiretamente processos de alto consumo de energia (MOORE et al, 2002).

As UCPs são proteínas mitocondriais localizadas na membrana interna e responsáveis por dissipar o gradiente de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) (NICHOLLS; RIAL, 1999), impedindo assim a formação de ATP

pela ATP sintetase (ATPase). Constituintes da família de proteínas carreadoras de ânions, as UCPs foram inicialmente identificadas no tecido adiposo marrom em mamíferos (RICQUIER; KADER, 1976; RICQUIER; BOUILLAUD, 2000), para depois serem encontradas em plantas (VERCESI et al, 1995), protozoários (UYEMURA et al, 2000), fungos (CAVALHEIRO et al, 2004; TUDELLA et al, 2004 e insetos (FRIDELL et al, 2004).

A atividade das UCPs está relacionada ao estímulo por ácidos graxos e inibição por nucleotídeos de purina, com exceção de ATP (SKULACHEV, 1991). Em *Acanthamoeba castelanii*, baixas concentrações de ácidos graxos levam a um estímulo do estado 4 da respiração (relativo ao nível basal) e consequente diminuição de $\Delta\Psi$ (JARMUSZKIEWICZ et al, 2010). Os ácidos graxos insaturados, como o linoleico e o oleico, são os que mais ativam esta via (SWIDA et al, 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre a regulação fisiológica das UCPs em outros eucariotos unicelulares (MARTINS et al, 2011). Em *A. fumigatus*, sabe-se que a ação dos ácidos graxos não é afetada por carboxiatractilosídeo, inibidor do *antiporter* de ATP/ADP (TUDELLA et al, 2004).

Estudos da participação da UCP na fosforilação oxidativa mostram que nos protistas *A. castelanii* e na levedura *Candida parapsilosis*, a eficiência desta via diminui durante o estado 3 da respiração de modo ácido graxo-dependente, semelhante ao encontrado em mamíferos e plantas (JARMUSZKIEWICZ et al, 2000; 2004; 2005; NAVET et al, 2005). Também é sugerida sua participação na defesa contra EROs, sendo observada a diminuição dos intermediários de oxigênio quando ativada pelos ácidos graxos (CZARNA; JARMUSZKIEWICZ, 2005).

1.6 A formação de EROs na mitocôndria

Durante o metabolismo celular normal, a fosforilação oxidativa possibilita a formação de EROs através do escape de elétrons principalmente nos complexos I e III, que reduzem incompletamente entre 2 - 5% do oxigênio mitocondrial (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007), sendo a taxa dessa formação dependente do potencial de membrana e do estado de redução dos complexos da CTE (MØLLER, 2001). O vazamento de um elétron reduz o oxigênio a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual pode ser dismutado para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RAHA; ROBINSON, 2001; RHOADS et al, 2006). Estes e outros intermediários reativos, como o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), formado através da reação entre H_2O_2 e metais de transição, são responsáveis por danos em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Diferentemente, EROs formadas por enzimas específicas (e.g. NADPH oxidase) estão envolvidas com importantes funções celulares, como transdução de sinal, proliferação e diferenciação (AGUIRRE et al, 2005; FINKEL, 2003; LAMBETH, 2004).

Além da produção mitocondrial, durante a invasão do hospedeiro pelo *A. fumigatus* ocorre a produção de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pelas células do primeiro, como uma forma de eliminar o patógeno (GROSS et al, 1999; LATGÉ, 2001). Através da mieloperoxidase e da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, macrófagos alveolares e neutrófilos sintetizam ácido hipocloroso e ânions superóxido, respectivamente, promovendo a morte do fungo (BALLOY; CHIGNARD, 2009).

Entretanto, o *A. fumigatus* apresenta agentes antioxidantes que atuam como mecanismos de resistência contra essas espécies reativas, aumentando sua capacidade infectiva (HAMILTON; HOLDON, 1999). Estes mecanismos podem ser

enzimáticos e não-enzimáticos. Dentre estes, além das enzimas descritas abaixo, diversas biomoléculas com diferentes funções celulares, como os transportadores dependentes de ATP, manitol, melanina e as proteínas da classe das chaperonas (NIERMAN et al, 2005; TEKAIA; LATGÉ, 2005).

1.7 Sistemas antioxidantes

Por ser local de produção de intermediários reativos, a mitocôndria possui sistemas antioxidantes que controlam a concentração dessas espécies, uma vez que o aumento em suas produções pode levar ao estresse oxidativo e consequentes danos à própria célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1993). Além disso, em fungos patogênicos foi observada a importância do controle da atividade e da regulação da expressão gênica das enzimas antioxidantes para o crescimento celular normal (KIM et al, 2006). Dentre os antioxidantes mitocondriais mais comuns e encontrados em *A. fumigatus*, estão as superóxido dismutases (SODs), catalases (Cat), glutationa (GSH), tiorredoxina ($T(SH)_2$) e glutarredoxina ($GRX(SH)_2$) (Figura 2).

A **superóxido dismutase (SOD)** catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1995). No fungo foram encontradas duas MnSODs, localizadas uma na matriz mitocondrial (SOD2) e outra no citoplasma (SOD3), uma Cu,ZnSODs, encontrada no citosol (SOD1) e uma que apresenta domínio C-terminal MnSOD (SOD4) (LAMBOU et al, 2010), denominada como FeSOD pelos bancos de dados atuais (CADRE, NCBI e AspGD). Com base nesses mesmos bancos é anotada outra Cu,ZnSOD citoplasmática para *A.fumigatus*. Durante o crescimento do fungo, SODs1 e 2 foram altamente expressas em conídios, enquanto SOD3 apresentou-se mais expressa em micélio (LAMBOU et al, 2010). Aparentemente nenhuma das MnSODs estão associadas com a virulência do

A. fumigatus, tampouco a Cu,ZnSOD. Inicialmente sugerida sua possível ação protetora contra superóxidos sintetizados extracelularmente e contra a formação de peroxinitrito (FANG, 1997; HAMILTON; HOLDOM, 1999), acredita-se que a atividade das Sods seja exclusivamente intracelular (LAMBOU et al, 2010).

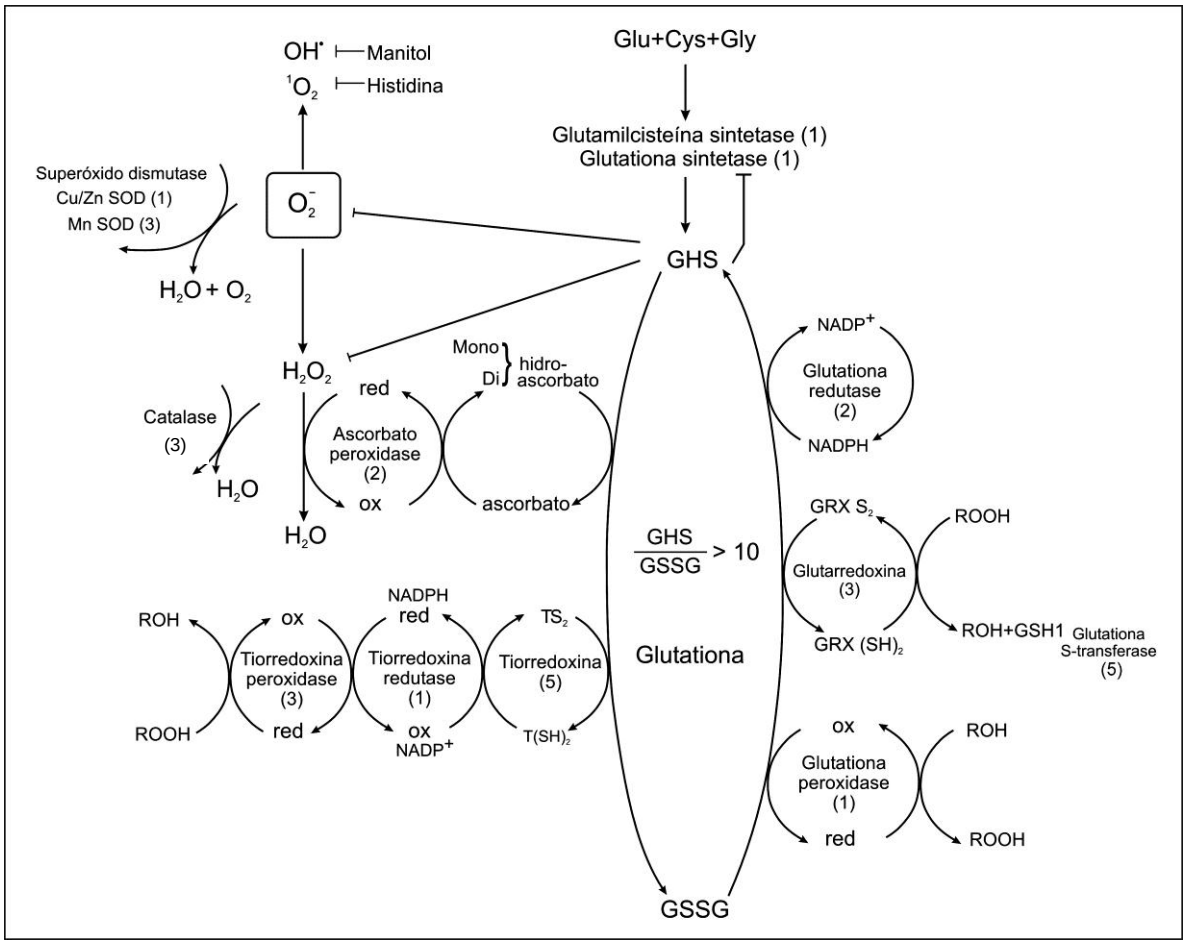


Figura 2 - Fluxograma da ação das enzimas antioxidantes de *A. fumigatus*. Em parêntesis, o número de genes de cada família de proteína (adaptado de ABAD et al, 2010, NIERMAN et al, 2005 e TEKAIA; LATGÉ, 2005).

A **catalase** tem a função de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O fungo possui três catalases ativas, sendo uma produzida pelo conídio (CatA) e duas pelo micélio (Cat1 e Cat2), sendo que Cat2 foi caracterizada como bifuncional (catalase-peroxidase) (PARIS et al, 2003; NIERMAN et al, 2005). A

catalase conidial não é considerada fator de virulência, diferentemente das duas miceliais, que ao serem deletadas conferiram virulência reduzida em ratos imunossuprimidos (PARIS et al, 2003).

O **sistema tiorredoxina** compreende oxidoredutases (tiorredoxina e tiorredoxina redutase) envolvidas em muitos processos celulares, como reparo de proteínas danificadas, síntese de desoxirribonucleotídeos e detoxificação de EROs. Caracterizada pela presença de duas cisteínas em seu sítio ativo, sua principal função é a manutenção do estado reduzido de proteínas que apresentam grupos sulfidrila livres (HOLMGREN, 1989) facilitada pela capacidade de ciclar entre seu estado dissulfeto (oxidado) e ditiol (reduzido) (THÖN et al, 2007).

As **peroxirredoxinas** formam uma família de peroxidases responsáveis pela redução de peróxidos endógenos, como H_2O_2, peroxinitrito ($OONO^-$) e outros hidroperóxidos orgânicos (CHAE; RHEE, 1994; HOFMANN; HECHT; FLOHÉ, 2002). Também denominadas tiorredoxina peroxidases, são encontradas no citosol, em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (WOOD et al, 2003). Com cisteínas como sítios primários para a função redox, são classificadas em dois grupos de acordo com o número de cisteínas envolvidas na catálise, as 1-Cys e 2-Cys peroxirredoxinas (CHAE; CHUNG; RHEE, 1994). Estas últimas são divididas em típicas e atípicas de acordo com suas estruturas e seus mecanismos de ação (WOOD et al, 2003).

Em *A. fumigatus* é encontrada a 1-Cys peroxirredoxina (Prx1) (CADRE), intimamente relacionada à atividade da tiorredoxina. A cisteína peroxidática da Prx1 reduz H_2O_2 a H_2O e seu estado reduzido é novamente alcançado a partir da tiorredoxina (KOHARYOVA; KOLAROVA, 2008). Assim, a importância da

tiorredoxina na resistência de *A. fumigatus* aos neutrófilos humanos também está associada à ação direta de Prx1 na detoxificação de H_2O_2 (LEAL JR. et al, 2012).

O **sistema glutationa/glutarredoxina** compreende oxidoredutases com funções semelhantes ao sistema tiorredoxina, e está envolvido na manutenção do ambiente intracelular reduzido (GRANT, 2001). A glutationa é um composto tiólico abundante no meio intracelular e os níveis de sua forma reduzida são mantidos pelo balanço entre síntese e redução. É sugerido que em diversos organismos a glutationa é também responsável pela resistência aos S-nitrosotióis, peroxinitrito e radical NO (KAPLAN et al, 1996; NEWTON et al, 1996) e que se constitui em cofator para diversas enzimas antioxidantes, como glutationa peroxidases e glutarredoxinas (GRANT, 2001). Visto que as EROs participam de vários processos celulares, como transdução de sinal, diferenciação, crescimento, proliferação e morte celular, o papel de detoxificação das mesmas pelos sistemas tiorredoxina e glutationa/glutarredoxina os tornam responsáveis indiretos pela regulação dessas atividades (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007). Recentemente foi sugerido o papel do sistema glutationa/glutarredoxina no metabolismo de ferro, sendo que concentrações traços de glutationa seriam suficientes para esta função, diferentemente de seu papel no controle redox, onde grandes concentrações do peptídeo seriam necessárias (KUMAR et al, 2011).

1.8 Oxidase alternativa (AOX) como sistema antioxidante

Além dos mecanismos de defesa citados acima, *A. fumigatus* utiliza a enzima AOX, um sistema antioxidante também usado por outros fungos, protozoários e plantas, que reduz a produção interna de EROs em condições de estresse oxidativo (BAI; HARVEY; MCNEIL, 2003; MOORE et al, 2002). Ausente em

mamíferos, seu gene foi identificado em cordados, moluscos e nematodos (MCDONALD; VANLERBERGUE, 2004), sendo que as AOX de vários grupos taxonômicos mostram resíduos de aminoácidos-chave conservados na região central da proteína (MCDONALD; AMIRSADEGHI; VANLERBERGHE, 2003).

A ativação da AOX em fungos ocorre na transição para a fase estacionária e em condições de estresse (BAI; HARVEY; MCNEIL, 2003). Em *A. fumigatus*, a AOX foi caracterizada através de seu recombinante expresso em *E. coli*, que não possui quinol:citocromo c oxido-redutase, bem como alguns componentes da cadeia de transporte de elétrons (e.g. desidrogenases e oxidases) (UNDEN; BOGAERTS, 2006). Ela é uma enzima de 40 kDa codificada por um gene (*aoxA*) de 1.173 pares de bases que apresenta 1.059 ORFs, sendo que sua sequência de aminoácidos apresentou significativa identidade com as sequências da mesma enzima de *A. niger*, *Neurospora crassa* e *Podospora anserina* (KIRIMURA; YODA; USAMI, 1999; LI et al, 1996; LORIN et al, 2001; MAGNANI et al, 2007). Sua expressão em *S. cerevisiae* também mostrou uma enzima funcional, uma vez que a cepa cresceu em ambiente com cianeto (MAGNANI et al, 2007), fato normalmente impossível pela ausência da respiração cianeto-resistente na levedura (MINAGAWA; YOSHIMOTO, 1987).

Além disso, a função da AOX certamente envolve a defesa antioxidante, demonstrado pelo aparecimento da respiração resistente ao cianeto e expressão de Af*aox* em conídios tratados com menadiona e paraquat, ambos formadores de EROs (MAGNANI et al, 2007). Esta hipótese é corroborada com a resposta às condições de estresse oxidativo *in vitro* e ao *killing* de macrófagos obtida com o silenciamento dos genes *aoxA* e *alb1*, este último responsável pela *poliketide synthase* (envolvida com a biossíntese de melanina) (MAGNANI et al, 2008). Este

fator é importante ao se tratar de *A. fumigatus* por interferir em sua sobrevivência aos macrófagos (PAPA; SKULACHEV, 1997) e em sua patogenicidade (MAGNANI et al, 2008).

1.9 PCR em tempo real

Dentre as técnicas de amplificação e quantificação de sequências específicas de ácidos nucleicos mais sensíveis está a reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real). A partir da combinação entre fluorescência e um sistema de detecção, a formação dos produtos é acompanhada em tempo real, não sendo necessárias outras técnicas para confirmação do resultado. Diferentemente de outras metodologias para a avaliação de expressão gênica, as situações em que pode ser empregada são variadas, a quantidade de amostras utilizadas é pequena, possui alta sensibilidade e dispensa menos trabalho (YUAN; ANG; STEWART JR., 2008). Além disso, diferente da PCR convencional, cujo produto final é detectado por eletroforese, não permitindo quantificação precisa do mesmo, a PCR em tempo real quantifica o número de cópias do gene de interesse obtidas em cada ciclo. Isto se dá através da detecção da fluorescência durante cada ciclo, uma vez que a quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de produto de PCR.

Como marcadores fluorescentes pode-se ter corantes que se ligam a DNA dupla fita (como SYBR Green) ou sondas sequência-específicas marcadas (TaqMan® e Molecular Beacons, por exemplo), mais específicas. Apesar do sistema SYBR ser o mais barato entre os sistemas de detecção, sua forma de ação permite ligações inespecíficas a qualquer dupla fita de DNA, seja o alvo de interesse, dímeros ou produtos de PCR não específicos. As sondas específicas, por sua vez,

são desenhadas de acordo com a sequência do gene de interesse e se baseiam na liberação do marcador fluorescente existente na porção 5' da sonda após a amplificação, a qual o separa de seu inibidor localizado na porção 3' (*quencher*). Assim, a fluorescência só é emitida se houver amplificação específica da sequência de interesse.

A fluorescência gerada com a amplificação é convertida em resultados pelo *software* associado ao termociclador. Ao se analisar o resultado de uma PCR em tempo real, a fase exponencial de amplificação fornece um valor de intensidade de fluorescência acima do *background* e muito abaixo do platô, denominado limiar ou *threshold*. A quantidade de ciclos necessária para que cada amostra emita fluorescência suficiente para atingir este limiar é o chamado ciclo de quantificação (C_q) (LEFEVER et al, 2009). Usado no cálculo da quantidade de ácido nucleico inicial de cada amostra, o C_q é inversamente proporcional à quantidade de alvo existente na amostra (POLONI, 2009). É a partir deste valor que são realizadas as quantificações.

Com a PCR em tempo real há a possibilidade de se realizar quantificações absolutas ou relativas. Na quantificação absoluta, o número de cópias do gene de interesse é determinado através de uma curva padrão, construída a partir de concentrações conhecidas de ácidos nucleicos. A quantificação relativa se baseia na análise das amostras através de sua comparação com uma amostra calibradora após a normalização de todas com um gene de referência, geralmente um gene constitutivo.

As análises estatísticas e o desenho experimental são a base para a reprodutibilidade e precisão dos resultados. Dentre esses fatores encontram-se a

boa qualidade do cDNA a ser usado, replicação dos resultados entre as amostras iguais e a presença de controles internos e externos (KLEIN, 2002).

2. Objetivos

2.1 Objetivo

Avaliar os níveis de transcrição dos genes de *A. fumigatus* na ausência e presença de diferentes agentes pró-oxidantes, em cepa controle e nocaute para oxidase alternativa, com ênfase em genes de componentes da cadeia de transporte de elétrons e de enzimas antioxidantes.

2.2 Planejamento

Em cepa CEA17 (controle) e Δ*aoxA* (nocauteada para oxidase alternativa), nas fases de germinante e hifa:

A. Avaliar os níveis de transcrição de genes responsáveis por enzimas que compõem a cadeia de transporte de elétrons na presença de pró-oxidantes;

B. Avaliar os níveis de transcrição de genes responsáveis por enzimas antioxidantes na presença de pró-oxidantes;

C. Avaliar as possíveis diferenças nos níveis de transcrição de um mesmo gene obtidos com diferentes pró-oxidantes;

D. Avaliar possível efeito da ausência de oxidase alternativa nos níveis de transcritos de enzimas da cadeia de transporte de elétrons e de enzimas antioxidantes;

E. Avaliar a atividade das enzimas catalase e oxidase alternativa e analisar possível congruência com o perfil de transcrição dessas enzimas.

3. Metodologia

3.1 Cultura celular

A cepa CEA17 *pyrG*$^+$ de *A. fumigatus* e o mutante Δ*aoxA*, deletado para o gene da oxidase alternativa, foram cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman da FCFRP-USP. O mutante foi construído a partir de *A. fumigatus* cepa CEA17 com auxotrofia para uracila (GRAHL et al, 2012) pelo grupo do Prof. Dr. Robert A. Cramer Jr. da Montana State University, Estados Unidos.

As cepas CEA17 *pyrG*$^+$ e Δ*aoxA* foram cultivadas em meio sólido YAG. Ambas foram mantidas por 4 dias a temperatura de 30°C. Depois do crescimento, os conídios foram recuperados com PBS/Tween 20 0,01% (v/v) e filtração em lã de vidro. As suspensões obtidas foram mantidas a 4°C para estoque ou utilizadas para experimentos.

3.2 Isolamento do DNA genômico (DNAg)

O DNA de *A. fumigatus* foi extraído pelo método descrito por VAN BURIK et al. (1998) com modificações. Para a produção de micélio, 2 x 10^7 conídios de *A. fumigatus* foram inoculados em meio YG acrescido de KH_2PO_4 100 mmol/L e incubados por 16 horas a 30°C, com agitação de 200 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e triturados com gral e pistilo. Cerca de 40 mg de micélio foram adicionados a 500 µL de tampão de extração de DNA, sendo incubados *overnight* a 56°C. Após este período, foi adicionado um volume igual de fenol em cada amostra e estas foram agitadas por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 20.800 x *g* por 5 minutos a 4°C, sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo de microcentrífuga. A adição de fenol e

subsequente centrifugação foram repetidas mais duas vezes, para minimizar a contaminação do produto final com proteínas. Em seguida, à fase aquosa foi adicionado clorofórmio na mesma quantidade. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 20.800 x *g* por 5 minutos a 4ºC, sendo a fase aquosa superior transferida para outro tubo de microcentrífuga. A adição de clorofórmio seguida de centrifugação foi repetida mais duas vezes para reduzir a contaminação por carboidratos. Em seguida, à fase aquosa foi adicionado acetato de sódio pH 5,2 para uma concentração final de 0,3 mol/L e 2 vezes o volume de etanol absoluto e incubou-se as amostras *overnight* a -20ºC. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 20.800 x *g* por 20 minutos a 4°C e seus sedimentos lavados duas vezes com etanol 70% (v/v). Estes foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para total evaporação do etanol e ressuspensos em água Milli-Q estéril. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm e sua pureza, através da razão 260 nm / 280 nm, sendo utilizadas apenas as amostras que obtiveram razões iguais ou acima de 1,90. Estas determinações foram obtidas através de *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific).

3.2.1 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas de acordo com Saiki et al (1985). 1 µL de DNAg extraídos ou DNA complementares (cDNAs) sintetizados foram incubados em meio contendo $MgCl_2$ 1,5 mmol/L, *primer forward* 0,4 µmol/L, *primer reverse* 0,4 µmol/L, dNTP 0,2 mmol/L e tampão 10X (KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,4), em volume final de 50 µL. Em seguida foi desnaturado através de incubação por 2 minutos (para cDNA) ou 5 minutos (no caso de DNAg) a 94°C. A reação foi iniciada pela adição da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante 1 U (Phoneutria).

As condições de reação para os oligonucleotídeos dos genes *aox*A e *pyrG*, para verificação da deleção do gene da AOX, foram de temperatura de desnaturação de 94ºC por 45 segundos, temperatura de anelamento de 60ºC por 1 minuto e extensão à 72ºC por 1 minuto e 30 segundos, com repetição de 35 ciclos. As condições para a PCR utilizando os oligonucleotídeos do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), para verificação da síntese de cDNA utilizado nos ensaios de PCR em tempo real, foram: temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida de temperatura de anelamento de 58°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com repetição de 30 ciclos. O equipamento utilizado foi um controlador termal programável (*Mastercycler Gradient* Eppendorf).

3.2.2 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os géis de agarose 1% (p/v) foram preparados com tampão TAE e às amostras foi adicionado tampão de amostra. As eletroforeses foram processadas em uma cuba contendo tampão TAE, utilizando 90 V durante 60 minutos. Os géis foram corados por imersão em uma solução contendo brometo de etídeo 0,25 µg/mL por 10 minutos, e em seguida lavados com água deionizada.

3.3 Uso de glicose oxidase para formação de peróxido de hidrogênio em meio de cultura (Apêndice 2)

Conídios de *A. fumigatus* CEA 17 crescido em meio YAG foram recuperados com PBS/Tween 20 0,01% (v/v) e filtração em lã de vidro. Em erlenmeyers de 250

mL adicionou-se 20 mL de meio YG pH 7,0 acrescido de KH_2PO_4 100 mmol/L e 4 x 10^8 conídios. Após a inoculação do fungo, adicionou-se glicose oxidase (GO) de *A. niger* (Sigma-Aldrich) 40 mU/mL (ZHANG et al, 2008). Como controles foram utilizadas amostras contendo somente o fungo e somente a enzima.

Em seguida, as culturas, em triplicata, foram mantidas sob agitação de 200 rpm por até 8 horas a 30ºC. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas para avaliação do consumo de glicose do meio pela enzima, do pH da cultura durante a atividade enzimática e da degradação do peróxido de hidrogênio pelo fungo.

3.3.1 Avaliação do consumo de glicose pela glicose oxidase

As alíquotas retiradas das culturas nos diferentes tempos foram centrifugadas a 13.000 x *g* por 5 minutos a 4°C para sedimentar os conídios. Em seguida, foram diluídas para uma concentração 10 vezes menor e 10 µL dessas soluções foram utilizados para a determinação da concentração de glicose presente no meio, utilizando o kit Glicose HK Liquiform (Labtest Diagnóstico). De acordo com as orientações do fabricante, a amostra foi diluída em 1 mL do reagente de trabalho e colocada em banho-maria durante 5 minutos a 37°C juntamente com o branco e a solução padrão. As absorvâncias foram determinadas a 340 nm em espectrofotômetro BTS-310 (BioSystems), acertando o zero com o branco.

3.3.2 Avaliação do pH da cultura durante a atividade da glicose oxidase

As alíquotas obtidas com os diferentes tempos foram centrifugadas a 3.200 x *g* por 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar os conídios. O pH foi imediatamente determinado através de pHmetro.

3.3.3 Avaliação da formação de peróxido de hidrogênio por glicose oxidase e sua degradação por *A. fumigatus*

A determinação da formação de peróxido de hidrogênio foi detectada pela sonda Amplex Red (Molecular Probes). Após centrifugação das amostras a 3.200 x *g* por 5 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram transferidos para outro tubo. Para cada 2 mL dos sobrenadantes foram adicionados *horseradish peroxidase* (HRP) 1 mU e Amplex Red 50 µmol/L. A determinação da fluorescência foi realizada com excitação a 563 nm e emissão a 587 nm em espectrofluorímetro *Hitachi*-F4500.

3.4 Exposição de *A. fumigatus* aos agentes pró-oxidantes

4 x 10^9 conídios de *A. fumigatus* das cepas CEA17 e Δ*aoxA* foram inoculados em 200 mL de meio YG/KH_2PO_4 100 mmol/L pH 7,0 e incubados sob agitação de 200 rpm por 8 horas a 30ºC na presença de menadiona 0,05 mmol/L, paraquat 1 mmol/L ou GO 40 mU/mL, compostos pró-oxidantes geradores EROs. Para micélios, ambas as cepas foram incubadas em mesmo meio de cultura por 16 horas antes do tratamento com os pró-oxidantes. Todas as culturas foram mantidas em erlenmeyers de 1 L e protegidas da luz.

Após a exposição aos pró-oxidantes, os germinantes foram coletados por centrifugação de 1811 x *g* por 5 minutos a 4ºC e lavagem com PBS. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo. Imediatamente após a coleta, todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80ºC para posterior extração de RNA.

3.5 Viabilidade de germinantes de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* por citometria de fluxo

Cerca de 5 x 10^6 conídios de CEA17 e Δ*aoxA* foram incubados a 200 rpm por 8 horas a 30°C com os agentes pró-oxidantes descritos acima na ausência de luz. Em seguida, foram centrifugados a 20.600 x *g* por 10 minutos à temperatura ambiente e lavados duas vezes com PBS.

Os germinantes foram ressuspensos em 200 µL de solução dextrose-hepes contendo 2,5 µmol/L da sonda FUN® 1 (Molecular Probes) e incubados na ausência de luz, sob agitação, por 30 minutos a 37°C. A adição de iodeto de propídio (PI) 0,5 µmol/L foi realizada no momento imediatamente anterior ao início das aquisições celulares.

As células foram analisadas em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD Biosciences), no qual foram adquiridos 10.000 eventos para cada análise realizada. Como parâmetros foram determinados o volume (*Forward Scatter* ou *FSC*) e a complexidade interna das células (*Side Scatter* ou *SSC*), sendo os dados analisados pelo *software CellQuest Pro 3.3* (BD Biosciences) .

3.6 Extração de RNA

As células obtidas como descrito anteriormente (item 3.4) foram rompidas por maceração em gral e pistilo previamente lavados com água-DEPC e autoclavados, utilizando nitrogênio líquido. A massa obtida foi imediatamente homogeneizada com 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) para a extração do RNA de acordo com as recomendações do fabricante.

A determinação da concentração de RNA foi realizada espectrofotometricamente através de *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific). Para verificar a integridade do RNA, 10 μg do RNA total de cada tratamento foram aplicados em gel de agarose 1,2% (p/v) com 2,2 mol/L formaldeído utilizando ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS) 1X como tampão de corrida. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. A presença de bandas intactas, referente aos RNAr 28 S e 18 S, foi utilizada como critério para verificar a qualidade da extração. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Promega). Em seguida realizou-se a purificação do RNA obtido com o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) utilizando o protocolo de purificação de RNA total de fungos filamentosos determinado pelo fabricante. Esta purificação permite a retirada de carboidratos contaminantes e de RNAs menores que 200 pb.

3.7 Desenho de oligonucleotídeos para PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram oligonucleotídeos LUX™ (Invitrogen) desenhados no programa *D-LUX™ Designer Software* (INVITROGEN). A sonda FAM foi escolhida para todos os oligonucleotídeos marcados (Tabela 1).

A escolha de cada um dos iniciadores foi determinada pela ausência de alinhamentos em mais de uma região do gene para o qual foi desenhado ou em região de outro gene do *A. fumigatus*, analisados através dos *softwares BLASTView* (CADRE) e *blastn suite* (NCBI). Também foram verificadas a formação de dímeros e a temperatura de dissociação de cada oligonucleotídeo através do *software* gratuito *Gene Runner*, obtido *online*.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real

Oligonucleotídeos	Sequência
Succinato desidrogenase, subunidade flavoproteína (AFUA_3G07810)	5' cggagGAAGATGGATGCAGTCTC[FAM]G 3' 5' AGCTTCTGCACGAGCGTCTG 3'
Isocitrato desidrogenase, dependente de NAD (AFUA_1G12800)	5' cggagaTGTTTCCCTTAACCTTACTCTC[FAM]G 3' 5' CAAGTTCGCAAACAGGTTGAAA 3'
Citocromo C oxidase subunidade V (AFUA_5G10560)	5' cgcttCACCAACGAGTACGCTAAG[FAM]G 3' 5' CCTCGTAGCCCTCACTGCTGAC 3'
Precursor da subunidade ferro-enxofre da ubiquinol-citocromo C redutase (AFUA_5G10610)	5' cggcTTTCTCCTACTTCATGGC[FAM]G 3' 5' AACAGTAGCCTTGGCACCAACA 3'
Proteína que confere sensibilidade a oligomicina na ATP sintetase, putativa (AFUA_2G12400)	5' cgcaaATGATGCTGGTCAGCTTG[FAM]G 3' 5' TCTCTCCAGCCTCGCTCAGAC 3'
NADH desidrogenase subunidade 23 kDa – Complexo I (AFUA_1G06610)	5' CggcaTGTCACTGTGGTATCGC[FAM]G 3' 5' AGAGTCCCAACCGTCGCAGAG 3'
NADH-ubiquinona oxidorredutase subunidade 64 kDa, putativa - NADH alternativa externa (AFUA_2G05450)	5' cggcATGTCACTGTGGTATCGC[FAM]G 3' 5' AGAGTCCCAACCGTCGCAGAG 3
NADH desidrogenase alternativa – NADH alternativa interna (AFUA_1G11960)	5' cggcTACAGAGAACGTCTGGGC[FAM]G 3' 5' TGGGCAGTGGGTGCATAGTT 3'
Oxidase Alternativa - AOX (AFUA_2G05060)	5' cggcCAAAGAATACTTTCCTCCGC[FAM]G 3' 5' ATGAACCCAGGCCGTCTCAAC 3'
Peptídeo RCI de resposta ao estresse, putativa (AFUA_5G03230)	5' cgggATAGAAAGCATGGATGTGACC[FAM]G 3' 5' ATGATTTCGGGTTGTAGTGTGGA 3'
Citocromo C peroxidase, putativa (AFUA_4G09110)	5' cggaaCTCCTACTACCTCCTCCTTC[FAM]G 3' 5' CCCTGAGCTGGGAGAGCAAA 3'
Tiorredoxina – Trx1 (AFUA_3G14970)	5' cggaaCTAAGCAGTCTACAAGCATTC[FAM]G 3' 5' GTAGGCGTCCACCAGCACCAG 3'
Cu, Zn superóxido dismutase - SOD1 (AFUA_5G09240)	5' cgagaCGGTGGTGGGAGAGTTCT[FAM]G 3' 5' GTCATTGCTGTCCTCCGTGGT 3'
Mn superóxido dismutase - SOD2 (AFUA_4G11580)	5' cggtgTGTGATTGAGGTGACCAC[FAM]G 3' 5' GTCGTACAGAGCCTCGTTGTCG 3'
Mn superóxido dismutase - SOD3 (AFUA_1G14550)	5' cggatTCACTAACCAACCCCATC[FAM]G 3' 5' TTCAAGGATGCTTTCAACACGA 3'
Cu, Zn superóxido dismutase citosólica - Cu,Zn SOD (AFUA_1G11640)	5' cggcTGACAAATGACAATGACGC[FAM]G 3' 5' CGCAGGGTCGTGTTCTGTCT 3'

Catalase micelial - Cat1 (AFUA_3G02270)	5' cggttAGAAACGAGTGGCAAAAC[FAM]G 3' 5' GTCGCAGGAAGCAGAGGTAGTTC 3'
Catalase-peroxidase bifuncional - Cat2 (AFUA_8G01670)	5' cggtgCCTGCTGGACATGAACAC[FAM]G 3' 5' GTCGCTGCCCTCGAACAACT 3'
Catalase esporo-específica - CatA (AFUA_6G03890)	5' cggacaAGCTCTTCTACAACTCAATGTC[FAM]G 3' 5' AAGCTGAAAGCCTTCTTCATGTG 3'
Glutarredoxina - Grx1 (AFUA_1G06100)	5' cggaaCGCATTCTGAATCTCTCTTC[FAM]G 3' 5' CCAGCAAGAAGACGCTCAAGG 3'
Peroxirredoxina mitocondrial - Prx1 (AFUA_4G08580)	5' cgcaTACAGGTGGGCAATCTTG[FAM]G 3' 5' GTCAATGGCTCCAAGCTCACC 3'
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - Gapdh (AFUA_5G01970)	5' cggcGACTGGTGCTGCTAAGGC[FAM]G 3' 5' CGGAGACGTTGGAGGTAGGAAC 3'

3.8 Uso de qPCR para a avaliação de genes diferentemente transcritos em *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* expostos a diferentes pró-oxidantes

3.8.1 RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa)

Aproximadamente 3 µg RNA livre de DNA eluído em água-DEPC foi submetido à reação de RT-PCR para a síntese de cDNA pela enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante.

Em um microtubo foram adicionados 0,01 µmol dNTP 10 mmol/L, 0,5 ng oligo $(dT)_{12-18}$ 0,5 µg/mL e 3 µg de RNA. Cada amostra foi incubada por 5 minutos a 65ºC e então colocada no gelo por pelo menos 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados 10X *First-Strand Buffer* (contendo Tris-HCl 250 mmol/L pH 8,3, KCl 375 mmol/L e $MgCl_2$ 15 mmol/L) para concentração final igual a 2X, DTT 0,1 µmol, RNAse OUT 40 U e *SuperScript* III RT 200 U. Após serem misturados gentilmente, foram incubados por 50 minutos a 50ºC. A reação foi inativada por incubação de 15 minutos a 70ºC.

3.8.2 Reação de qPCR

A quantificação relativa dos níveis de expressão dos genes selecionados foi realizada em sistema Realplex 4S (Eppendorf).

As possíveis variações na concentração inicial de RNAm entre as amostras foram corrigidas através da normalização com o gene constitutivamente expresso *gapdh*.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata com volume final de 10 µL contendo 5 µL do reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1,5 µL dos oligonucleotídeos a concentração de 1 µmol/L cada e 2 µL de cDNA. Estas reações foram montadas em estação robotizada ep*Motion* 5070 (Eppendorf). O perfil termal utilizado foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos 60°C por 1 minuto. Foram realizados controles contendo apenas o reagente *Master Mix* e os oligonucleotídeos para verificação de contaminações e auto-fluorescência dos oligonucleotídeos marcados.

Inicialmente foram realizadas curvas de calibração para os pares de oligonucleotídeos 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 no genoma. Além disso, considerando que o tamanho do genoma 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 2) do DNA genômico do fungo e, por meio de regressão linear realizada pelo *software*

Realplex 2.2, foi determinada a equação da reta correspondente à curva de calibração para cada par de oligonucleotídeo. Foram utilizadas as curvas que atingiram coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9.

Tabela 2 - Diluições do DNA genômico para a construção da curva de calibração dos oligonucleotídeos

Número de cópias/µL	**Concentração de DNA**
1	30 fg/µL
10	300 fg/µL
10^2	3 pg/µL
10^3	30 pg/µL
10^4	300 pg/µL
10^5	3 ng/µL
10^6	30 ng/µL
10^7	300 ng/µL

Uma vez estabelecido o *slope* através das equações obtidas com as curvas de calibração, as eficiências (*E*) de cada reação de amplificação foram calculadas como descrita por Rasmussen (2001) segundo a equação:

$$E=10^{[-1/slope]}$$

em que,

slope = é o coeficiente de regressão da curva de calibração

Para a determinação do nível de transcritos relativo dos produtos de qPCR utilizou-se o modelo proposto por Pfaffl (2001):

$$Razão = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Cq_{alvo}(controle-amostra)}}{(E_{referência})^{\Delta Cq_{referência}(controle-amostra)}}$$

em que,

Razão = é o nível de transcritos relativo entre o gene alvo e o gene de referência;

E_{alvo} = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene alvo;

$E_{referência}$ = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene de referência,

ΔCq_{alvo} = é desvio de (*Cq* do controle – amostra do gene alvo transcrito);

$\Delta Cq_{referência}$ = é desvio de (*Cq* do controle – amostra do gene de referência transcrito).

Assim, a razão entre os transcritos dos genes de interesse e os transcritos de *gapdh* determinou o nível de transcritos relativo de cada gene estudado. A média de *Cq* das amostras de CEA17 sem tratamento foi utilizada como grupo controle (calibrador) para as comparações entre os outros grupos amostrais.

3.9 Determinação da atividade enzimática de oxidase alternativa e catalase em *A. fumigatus* exposto à menadiona

3.9.1 Exposição de *A. fumigatus* à menadiona

Conídios de *A. fumigatus* CEA 17 e Δ*aoxA* foram recuperados de meio sólido com PBS/Tween 20 0,01% (v/v) e filtração em lã de vidro. O procedimento para a exposição celular à menadiona, bem como sua concentração, foi o mesmo citado no item 3.4. Apenas o volume de cultura celular utilizado foi diminuído para 100 mL com 2 x 10^9 conídios inoculados em erlenmeyers de 500 mL, protegidos da

luz. Ambas as fases de desenvolvimento celular (germinantes e hifas) foram utilizadas.

Após a exposição à menadiona, os germinantes foram coletados por centrifugação (1811 x *g* por 5 minutos a 4ºC) e lavados com PBS. As hifas foram recuperadas por filtração a vácuo. Imediatamente após a coleta, todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para posterior preparo de extrato proteico total quando utilizadas para ensaio de catalase. Para a determinação da atividade de AOX, as amostras foram ressuspensas em meio YG + KH_2PO_4 100 mmol/L acrescido de 3,8 µL PIC/ 1g de massa seca de células e imediatamente utilizadas. Neste caso, o volume de ressuspensão foi igual para cada amostra correspondente à mesma fase de desenvolvimento.

3.9.2 Influência de AOX na velocidade de consumo de oxigênio

A velocidade de consumo do oxigênio foi monitorada polarograficamente por oxígrafo acoplado a eletrodo do tipo *Clark* (Gilson Medical Eletronics). Os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com Chance e Williams (1956). Em câmara com volume final de 1,8mL de meio YG + KH_2PO_4 100 mmol/L foram verificadas as velocidades inicial e após a adição de KCN 2 mmol/L e SHAM 2 mmol/L. A velocidade de consumo de oxigênio foi calculada em relação à concentração do extrato proteico total e ao volume celular adicionado à câmara de respiração, sendo os resultados dados por micrograma de proteína.

3.9.3 Obtenção de extrato proteico total

As células obtidas como descrito anteriormente (item 3.9.1) foram rompidas utilizando nitrogênio líquido em gral e pistilo previamente autoclavados. A massa

obtida foi imediatamente pesada e homogeneizada com tampão de extração de proteína na proporção 10 mL / 4 g de massa celular seca. Em seguida, as amostras foram sonicadas 10 vezes por 10 segundos (amplitude de 50%), com intervalos de 1 minuto a 4ºC entre cada sonicação.

As suspensões foram centrifugadas a 18.500 x *g* por 30 minutos a 4ºC para a remoção de debris celulares e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios de atividade da catalase, sendo estocados a -20ºC. A concentração de cada extrato proteico total foi determinada pelo método de BCA, utilizando o *kit Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) de acordo com as especificações do fabricante.

3.9.4 Atividade de catalase

A atividade de catalase foi determinada através do *Amplex® Red Catalase Assay kit* (Molecular Probes) de acordo com as orientações do fabricante. A interação de Amplex Red com H_2O_2, não decomposto pela catalase presente no extrato proteico total, leva à formação de resorufina, um produto fluorescente.

Em placa de 96 poços, as amostras de extratos proteicos de *A. fumigatus*, em triplicata, foram incubadas na presença de 20 µmol/L H_2O_2 por 30 minutos a 25°C protegidas da luz. Em seguida foram adicionados Amplex Red 25 µmol/L e HRP 0,1 U/mL. Após incubação por 30 minutos a 37ºC a fluorescência foi determinada utilizando o leitor de microplaca *Synergy* 2 (BioTek®) com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os valores de fluorescência das amostras foram subtraídos do obtido com a amostra “branco” (sem catalase), determinando os valores correspondentes ao consumo do peróxido pela catalase presente nos extratos proteicos. A partir da equação da reta obtida com a curva de calibração da catalase (de 0 a 1000 mU/mL),

foram calculadas as concentrações da enzima em cada amostra. A divisão dessas concentrações pela concentração proteica dos extratos totais permitiu a determinação da atividade específica de cada amostra.

3.10 Análises estatísticas

As análises realizadas para a determinação da viabilidade celular na presença dos pró-oxidantes basearam-se na análise de variância de uma via, utilizando o pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Para isto foi utilizado o programa *GraphPad Prism*™ 5.

As análises descritivas para qPCR e atividade específica da catalase foram realizadas por meio de procedimento PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.1 (SAS, 1999), visando obter as estatísticas descritivas para as diferentes variáveis avaliadas, bem como, a verificação das pressuposições anteriores às análises inferenciais propriamente ditas.

Os dados relativos aos níveis de transcritos das enzimas obtidos por meio do qPCR foram analisados considerando-se as cepas e os tratamentos por meio da análise de variância, utilizando o procedimento PROC MIXED, do programa acima citado, de acordo com o modelo estatístico abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + F_i + T_j + FT_{ij} + e_{ijk}$$

em que,

y_{ijk} = é o nível de transcrito para a enzima em questão, observado na amostral k, no tratamento j, pertencente à cepa i;

μ = constante inerente a todas as observações;

F_i = efeito de i-ésima cepa, sendo i = 1 (CEA17) e 2 (Δ*aoxA*);

T_j = efeito do j-ésimo tratamento, sendo j = 1 (controle), 2 (menadiona), 3 (paraquat) e 4 (glicose oxidase);

e_{ijk} = efeito aleatório residual associado ao nível de transcrito para a enzima em questão, observado na amostral k, no tratamento j, pertencente ao fungo i;

Em caso de resultados significativos ($P < 0,05$) para as fontes de variações avaliadas nas análises de variância anteriormente citada, adotou-se como procedimento para comparações múltiplas o Teste de Tukey e a seguinte estratégia: (i) em caso de somente efeito(s) principal(is) significativo(s), utilizou-se como procedimento de comparações múltiplas o modelo descrito acima; (ii) em caso de interações significativas, procedeu-se os desdobramentos das diferentes cepas dentro de cada tratamento avaliado, bem como o desdobramento dos tratamentos dentro de cada cepa avaliada. Nestas análises utilizou-se o Teste F e, quando necessário, aplicou-se o Teste de Tukey, como procedimento de comparações múltiplas.

4. Resultados

4.1 Verificação da deleção do gene da oxidase alternativa em mutante de *A. fumigatus*

A verificação do uso de um mutante ΔAOX foi realizada a partir da PCR com o DNAg extraído da cepa ΔAOX de *A. fumigatus* utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *pyrG*, que originaram fragmentos de 1.902 pares de base (pb) e o gene de AOX (*aoxA*), gerando fragmentos de 2.934 pb. Ambos os pares de oligonucleotídeos correspondiam não só aos genes, mas também a parte das regiões flanqueadoras de cada gene. Como controle positivo da reação foi utilizado DNAg de *A. fumigatus* cepa CEA 17 *pyrG*$^+$, prototrófica e não mutada para *aoxA*.

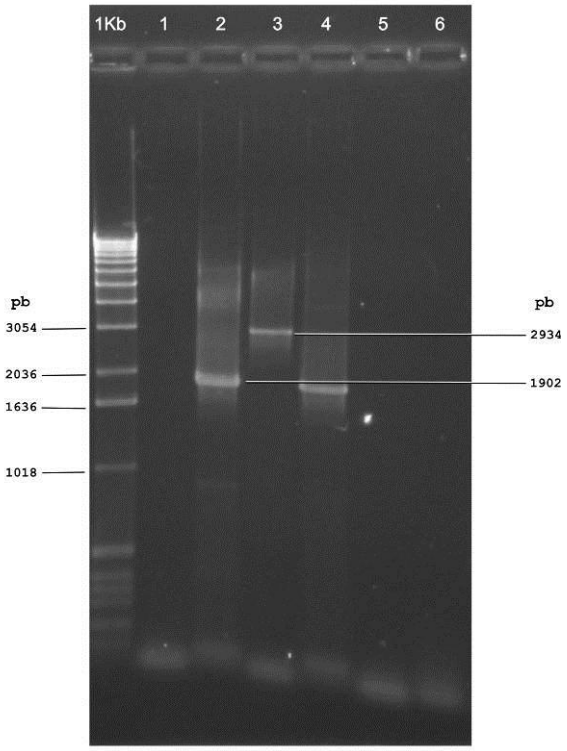


Figura 3 - Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE dos fragmentos dos produtos obtidos com oligonucleotídeos para os genes *pyrG* e *aoxA* de *A. fumigatus* cepa CEA17 e mutante AoxA. 1Kb: padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); 1: ausência de banda quando da reação oligonucleotídeo *aoxA*/DNAg cepa Δ*aoxA*; 2: gene *pyrG* na reação oligonucleotídeo *pyrG*/DNAg cepa Δ*aoxA*; 3: gene *aoxA* na reação oligonucleotídeo *aoxA*/DNAg cepa CEA 17; 4: gene *pyrG* na reação oligonucleotídeo *pyrG*/DNAg cepa CEA 17; 5: controle negativo para oligonucleotídeo *aoxA*; 6: controle negativo para oligonucleotídeo *pyrG*.

Na Figura 3, as canaletas 1 e 2 representam os fragmentos obtidos com os oligonucleotídeos de *aoxA* e do gene *pyrG*, respectivamente, a partir do DNAg do mutante Δ*aoxA*. Observa-se que não houve detecção de banda na canaleta 1, indicando que o gene da oxidase alternativa encontra-se deletado. Nas canaletas 3 e 4 estão os resultados das reações com os mesmos oligonucleotídeos, porém a partir do DNAg obtido com a cepa CEA 17. Nota-se a presença de bandas nas duas condições. As canaletas 5 e 6 são representantes do controle negativo de ambos os jogos de oligonucleotídeos.

4.2 Viabilidade de germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA* na presença de pró-oxidantes

A presença de agentes pró-oxidantes no meio de cultura de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* permite o contato do fungo com EROs que, dependente de suas concentrações, podem promover morte celular. Entretanto, como o interesse do trabalho foi estudar a diferença na transcrição gênica de fungos submetidos à ação de EROs, foi importante avaliar o menor índice de morte celular e a presença de números significativamente iguais de células viáveis após o tratamento com os pró-oxidantes, se fazem importantes.

A viabilidade de *A. fumigatus* pode ser determinada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após diluições seriadas. Entretanto, esta é uma técnica que apresenta limitações, uma vez que o erro é induzido por alterações morfológicas (conídios e hifas), fragmentações das hifas, restos celulares e agrupamento entre conídios durante seu desenvolvimento (MARR et al, 2001). Devido a estes fatores, a viabilidade dos germinantes de CEA17 e Δ*aoxA* foi

determinada através de citometria de fluxo utilizando as sondas FUN®1 e iodeto de propídio (PI) como marcadores de células metabolicamente viáveis e mortas, respectivamente.

Os agentes pró-oxidantes menadiona 0,05 mmol/L, paraquat 1 mmol/L e glicose oxidase 40 mU/mL foram adicionados ao meio de cultura onde estavam inoculados conídios de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA*. Após 8 horas de incubação a 30°C foi realizada a marcação dos germinantes com as sondas fluorescentes FUN®1 e PI. A determinação por citometria de fluxo promoveu a separação entre as populações celulares de acordo com a marcação incorporada.

Foram identificadas quatro subpopulações: Q1 representa a população de conídios mortos (PI positivos); Q4 corresponde às células metabolicamente ativas (FUN® 1 positivas); em Q2 estão representados os conídios PI e FUN®1 positivos, que perderam a integridade da membrana ou tiveram-na alterada pelo processo de maturação celular (MARR et al, 2001) ou pela presença de EROs, que podem levar a peroxidação lipídica, porém sem perda da atividade metabólica; Q3 representa os conídios mortos (FUN®1 negativos), mas sem destruição celular (PI negativos).

Independente da cepa ou do pró-oxidante utilizado, a porcentagem de células metabolicamente ativas (Q4) foi maior do que as células não viáveis (Apêndice 4; Figuras 6 e 7). Não foi observada porcentagem significativa de células mortas em nenhuma das condições testadas para ambas as cepas (Figuras 6 e 7, Q1). O pequeno aumento da porcentagem de células com perda da integridade da membrana plasmática (Q2) em CEA17 tratada com paraquat (Figura 6) e com morte sem destruição da estrutura celular (Q3) em Δ*aoxA* tratada com menadiona (Figura 7) sugere sensibilidade das cepas estudadas aos respectivos pró-oxidantes. Não

houve significância ($P < 0,05$) entre as subpopulações Q1, Q2 e Q3 ao se considerar os três tratamentos e o controle.

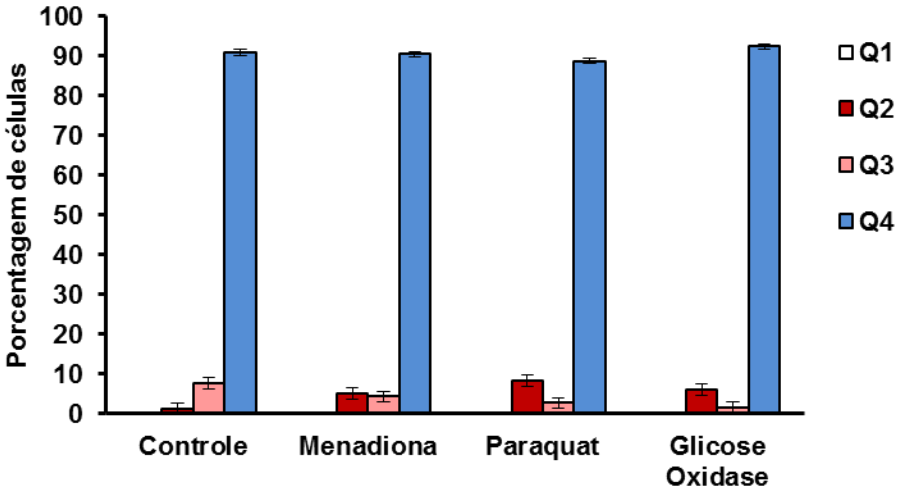


Figura 4 - Viabilidade celular de *A. fumigatus* CEA17 na presença de pró-oxidantes. O grupo controle não recebeu nenhuma droga geradora de EROs. Os resultados são dados em porcentagem de células em cada estado fisiológico (Q1: células mortas; Q2: células com alteração na membrana; Q3: células mortas, sem destruição celular; Q4: células metabolicamente ativas). Todas as diferenças são significativas ao se comparar Q4 com as outras subpopulações, tanto em controle quanto em tratados ($P < 0,05$).

4.3 Avaliação de genes diferencialmente transcritos em germinantes e hifas de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* após a exposição a diferentes agentes pró-oxidantes

Os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados para a avaliação da transcrição dos genes relacionados à cadeia de transporte de elétrons e à defesa antioxidante encontram-se listados na Tabela 1. Para a análise optou-se por realizar quantificação relativa utilizando curvas padrão de todos os genes estudados para o cálculo da eficiência de cada oligonucleotídeo. A metodologia de cálculo utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (*média do* ΔC_q *amostra – média do* ΔC_q *amostra de referência*) obrigaria os genes alvos apresentarem eficiências comparáveis à dos genes de

referência. Assim, para calcular a eficiência real de cada par de oligonucleotídeo e a razão entre as amostras e o controle (CEA17 sem tratamento), foram utilizados métodos descritos por Rasmussen (2001) e Pfaffl et al (2001), respectivamente.

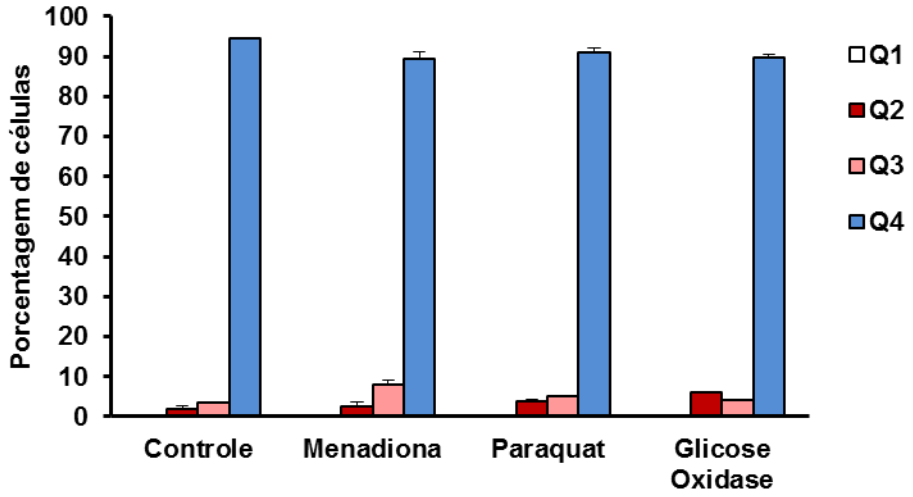


Figura 5 – Viabilidade celular de *A. fumigatus* Δ*aoxA* na presença de pró-oxidantes. O grupo controle não recebeu nenhuma droga geradora de EROs. Os resultados são dados em porcentagem de células em cada estado fisiológico (Q1: células mortas; Q2: células com alteração na membrana; Q3: células mortas, sem destruição celular; Q4: células metabolicamente ativas). Todas as diferenças são significativas ao se comparar Q4 com as outras subpopulações, tanto em controle quanto em tratados ($P < 0,05$).

A seguir são mostrados os resultados obtidos de acordo com cada gene estudado. Os mesmos resultados são agrupados por funções e apresentados em figuras (Figuras 33 a 38), separados por cada tratamento realizado.

4.3.1 Componentes da Cadeia Respiratória

4.3.1.1 NADH desidrogenase (Complexo I – *c I*)

As alterações nos níveis de transcritos de *c I* foram determinadas pelo efeito do tratamento, não sendo significativo o efeito da deleção de *aoxA* nesses resultados (Tabela 3, Figura 6). Menadiona foi o único pró-oxidante responsável por

essas variações, sendo que em germinantes, os níveis foram inferiores ao controle (0,65 vezes) e em hifas, superiores (1,85 vezes). Os outros tratamentos não apresentaram variações significativas em relação ao controle.

Tabela 3 - Níveis médios de transcrição de *c l* em germinantes e hifas, por tratamento.

Tratamento	Germinantes[1]	Hifas[1]
Controle	0,93 A	0,94 B
Menadiona	0,65 B	1,85 A
Paraquat	0,99 A	0,63 B
GO	0,92 A	0,81 B
EP	0,06	0,09

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

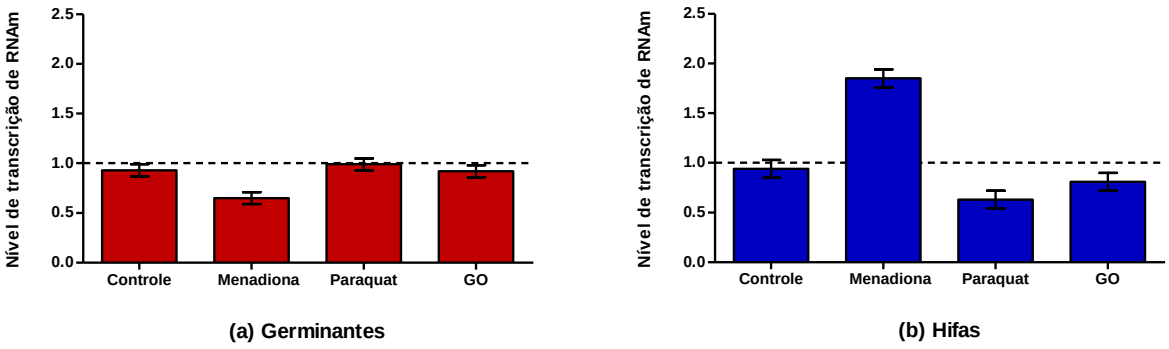


Figura 6 - Níveis de transcrição de *c l* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.1.2 Succinato desidrogenase (Complexo II – *sdh1*)

A interação cepa vs. tratamento influenciou significativamente ($P < 0,05$) os níveis de transcritos de *sdh1* e menadiona foi responsável pelas principais alterações nesses níveis (Tabela 4).

Ao se analisar os resultados obtidos em hifas de CEA17 e Δ*aoxA*, observou-se que menadiona foi o único pró-oxidante que proporcionou aumento (3,68 e 2,71 vezes, respectivamente) em relação ao controle, sendo que o índice atingido em CEA17 foi maior que o observado em Δ*aoxA* (Tabela 4, Figura 7b). Maior aumento de transcritos também foi observado em Δ*aoxA* em relação à CEA17 no tratamento com paraquat (1,58 vezes contra 0,95 vezes), não sendo estes valores superiores ao controle. Em germinantes, os níveis de transcritos observados em CEA17 com os diferentes tratamentos são inferiores ao controle, porém não diferem entre si. Em Δ*aoxA*, menadiona e GO propiciaram menores níveis de transcritos (0,32 vezes e 0,64 vezes, respectivamente) (Tabela 4; Figura 7a).

Tabela 4 - Níveis médios de transcrição de *sdh1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [A; a]	0,87 [A; a]	1,00 [B; a]	1,26 [B; a]
Menadiona	0,74 [B; a]	0,32 [C; b]	3,68 [A; a]	2,71 [A; b]
Paraquat	0,73 [B; a]	0,71 [AB; a]	0,95 [B; b]	1,58 [B; a]
GO	0,74 [B; a]	0,64 [B; a]	1,45 [B; a]	1,43 [B; a]
EP	0,06	0,06	0,18	0,18

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

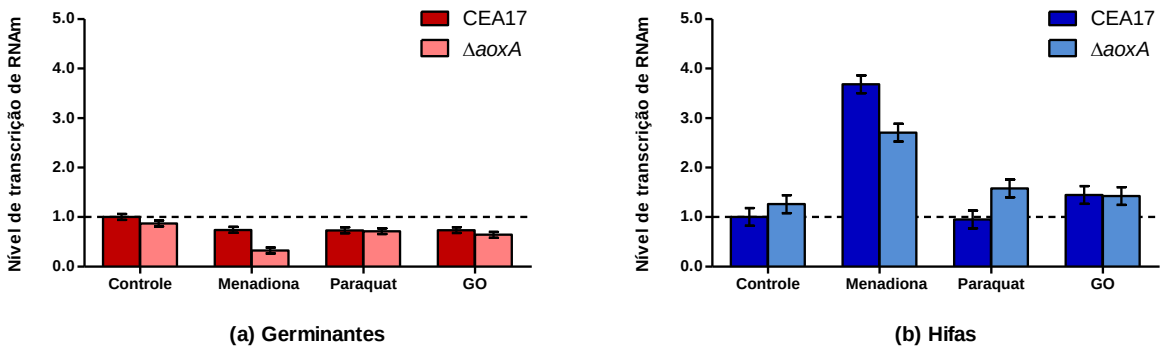


Figura 7 - Níveis de transcrição de *sdh1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.1.3 Citocromo C redutase (Complexo III – *c III*)

As análises dos níveis de transcritos de *c* levaram à observação de diferentes influências das variáveis de acordo com a fase de desenvolvimento celular. Em germinantes, a interação cepa vs. tratamento foi determinante para as respostas obtidas (Tabela 5), enquanto que em hifas, essas variáveis influenciaram os resultados de modo independente, uma vez que a interação entre elas não foi significativa (Tabelas 6 e 7).

Em hifas, os níveis de transcrição obtidos com CEA17 e Δ*aoxA* expostas ao paraquat foram menores que o controle (0,32 vezes), enquanto que GO promoveu aumento desses níveis para 1,22 vezes (Tabela 6; Figura 9a). Menadiona não teve efeito significativo nesta fase de desenvolvimento. Ao se comparar os resultados obtidos com as cepas, observou-se que a transcrição de C III em Δ*aoxA* foi maior que em CEA17 (Tabela 7; Figura 9b).

Tabela 5 - Níveis médios de transcrição de *c III* em germinantes, por tratamento e por cepa.

	Cepas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [A; a]	1,05 [A; a]
Menadiona	0,91 [A; a]	0,47 [B; b]
Paraquat	0,93 [A; a]	1,11 [A; a]
GO	0,93 [A; a]	1,03 [A; a]
EP	0,08	0,08

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

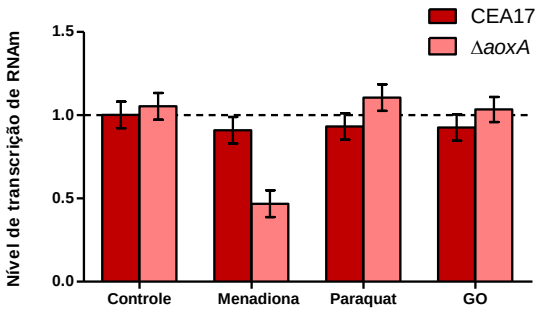


Figura 8 - Níveis de transcrição de *c III* em germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Tabela 6 - Níveis médios de transcrição de *c III* em hifas, por tratamento.

Tratamento	Hifas[1]
Controle	1,03 [B]
Menadiona	0,94 [B]
Paraquat	0,32 [C]
GO	1,22 [A]
EP	0,05

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Tabela 7 - Níveis médios de transcrição de *c III* em hifas, por cepa.

	Cepas	
	CEA17[2]	Δ*aoxA*[2]
	0,82 [b]	0,93 [a]
EP	0,03	0,03

[2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

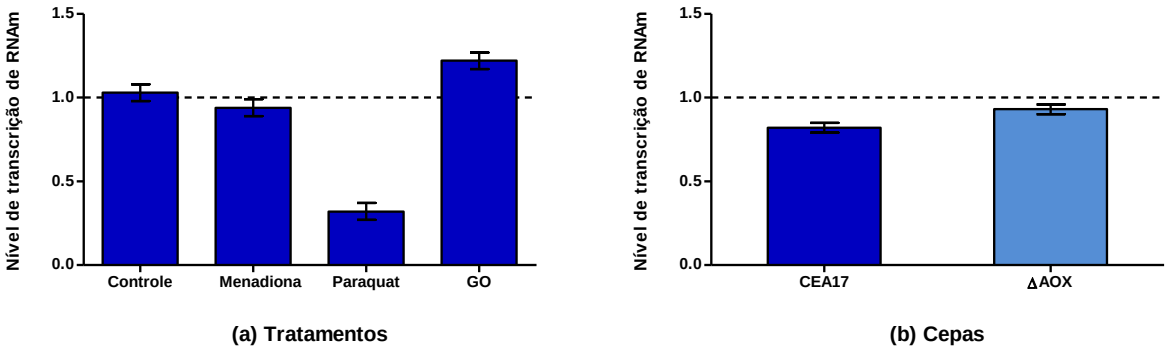


Figura 9 - Níveis de transcrição de *c III* em hifas de *A. fumigatus* de acordo com a exposição aos diferentes agentes pró-oxidantes (a) e as cepas (b). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.1.4 Citocromo C oxidase (Complexo IV – *c IV*)

A interação entre a cepa e o tratamento foi determinante para os níveis de transcritos de *c IV* (Tabela 8).

Dentre as duas fases de desenvolvimento estudadas, as hifas foram as que apresentaram maior variação nos níveis de transcritos de *c IV* (Tabela 8; Figura 10). Menadiona foi o pró-oxidante que promoveu os maiores aumentos desses níveis (4,74 vezes para CEA17 e 11,70 vezes para Δ*aoxA*), (Tabela 8; Figura 10b). Paraquat também aumentou os níveis de transcritos de C IV para 2,46 vezes em CEA17 e 2,65 vezes em Δ*aoxA*, mas ambos são estatisticamente iguais entre si (Tabela 8; Figura 10b). Os resultados obtidos com GO foram semelhantes aos do controle.

Tabela 8 - Níveis médios de transcrição de *c IV* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [A; a]	0,70 [B; b]	1,01 [C; a]	0,78 [C; a]
Menadiona	0,61 [B; a]	0,75 [B; a]	4,74 [A; b]	11,70 [A; a]
Paraquat	1,07 [A; a]	1,06 [A; a]	2,46 [B; a]	2,65 [B; a]
GO	1,12 [A; a]	1,19 [A; a]	0,99 [C; a]	1,31 [C; a]
EP	0,07	0,07	0,28	0,28

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Os níveis de transcritos observados em germinantes foram de um modo geral, menores que os apresentados por hifas. Controle de Δ*aoxA*

apresentou nível inferior (0,70 vezes) ao controle de CEA17. Menadiona promoveu diminuição dos níveis de transcritos tanto em CEA17 (0,61 vezes) quanto em Δ*aoxA* (0,75 vezes), enquanto que os valores para a exposição ao paraquat e à GO não foram significativamente diferentes ao controle em ambas as cepas (Tabela 8; Figura 10a).

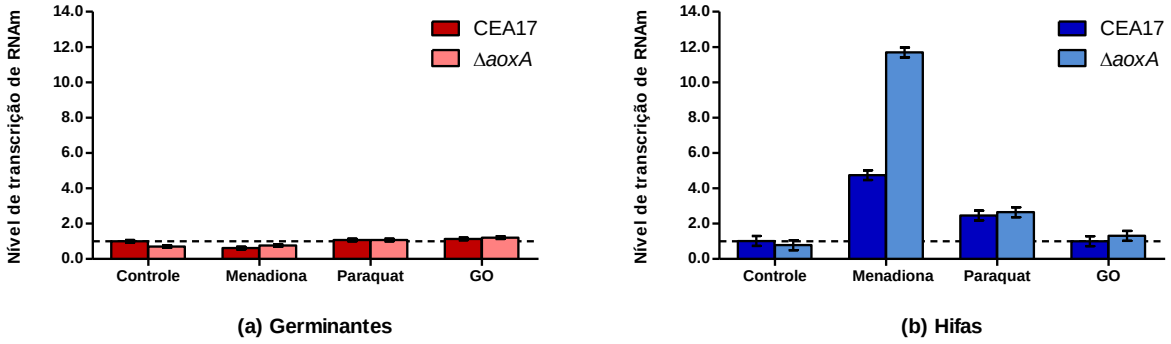


Figura 10 - Níveis de transcrição de *c IV* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.1.5 ATP sintetase (*atpase*)

Em *atpase*, a interação cepa x tratamento também influenciou significativamente ($P < 0,05$) os resultados obtidos.

Em germinantes, nenhum dos pró-oxidantes utilizados promoveu alteração nos níveis de transcritos de *atpase* em relação ao controle (Tabela 9; Figura 11a). Entretanto, em hifas, todos os tratamentos diminuíram os níveis de transcritos, com exceção de menadiona (Tabela 9; Figura 11b).

Os níveis apresentados por hifas de Δ*aoxA* sem tratamento (0,62 vezes) foram inferiores ao controle e ao tratamento com GO (1,12 vezes), mas superiores ao obtido com paraquat (0,28 vezes) (Tabela 9; Figura 11b). Em CEA17, o menor

nível de transcrito observado foi o obtido com paraquat (0,30 vezes), seguido por GO (0,69 vezes). Porém, os valores observados em CEA17 tratados com GO foram inferiores à mesma condição em Δ*aoxA* (Tabela 9; Figura 11b).

Tabela 9 - Níveis médios de transcrição de *atpase* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,02 A; a	1,30 A; a	1,06 A; a	0,62 BC; b
Menadiona	0,90 A; a	1,19 A; a	0,83 AB; a	0,71 B; a
Paraquat	1,30 A; a	1,47 A; a	0,30 C; a	0,28 C; a
GO	1,10 A; a	1,15 A; a	0,69 B; b	1,12 A; a
EP	0,19	0,19	0,11	0,11

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

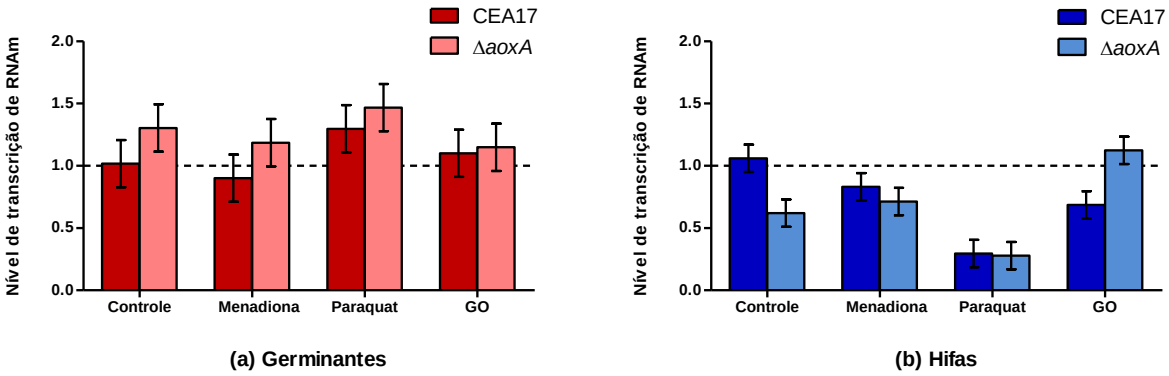


Figura 11 - Níveis de transcrição de *atpase* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.2 Componentes alternativos mitocondriais

4.3.2.1 NADH desidrogenase alternativa interna (*ndiA*)

A interação cepa vs. tratamento foi determinante para a variação dos níveis de transcritos, de *ndiA*. Em germinantes e hifas não houve aumento dos níveis de transcritos em relação ao controle em nenhuma das situações estudadas. Em ambas as fases de desenvolvimento, Δ*aoxA* sem tratamento apresentou média de 0,75 vezes, valor também inferior ao controle de CEA17 (Tabela 10; Figura 12).

Em germinantes de CEA17, menadiona e paraquat foram responsáveis pela diminuição dos níveis de transcritos (0,45 e 0,39 vezes, respectivamente). Em Δ*aoxA*, as mesmas condições geraram valores próximos no tratamento com menadiona (0,40 vezes) e com paraquat (0,61 vezes). O nível de transcrição promovido pela exposição à GO também foi menor que o controle (0,71 vezes), porém semelhante a Δ*aoxA* controle (Tabela 10; Figura 12a).

Tabela 10 - Níveis médios de transcrição de *ndiA* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [A; a]	0,75 [A; b]	1,02 [A; a]	0,75 [A; b]
Menadiona	0,45 [B; a]	0,40 [B; a]	0,97 [A; a]	0,49 [AB; b]
Paraquat	0,39 [B; a]	0,61 [AB; a]	0,19 [C; a]	0,33 [B; a]
GO	0,89 [A; a]	0,71 [A; a]	0,63 [B; a]	0,70 [A; a]
EP	0,06	0,06	0,08	0,08

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Em hifas de CEA17, paraquat foi responsável por nível de transcritos inferior ao controle (0,19 vezes). Em Δ*aoxA* o nível de transcritos foi estatisticamente semelhante (0,33 vezes) e menor que o observado no controle desta mesma cepa (0,75 vezes). GO também promoveu diminuição dos níveis de transcritos em CEA17 (0,63 vezes), semelhante à Δ*aoxA* sem tratamento (0,75 vezes) (Tabela 10; Figura 12b).

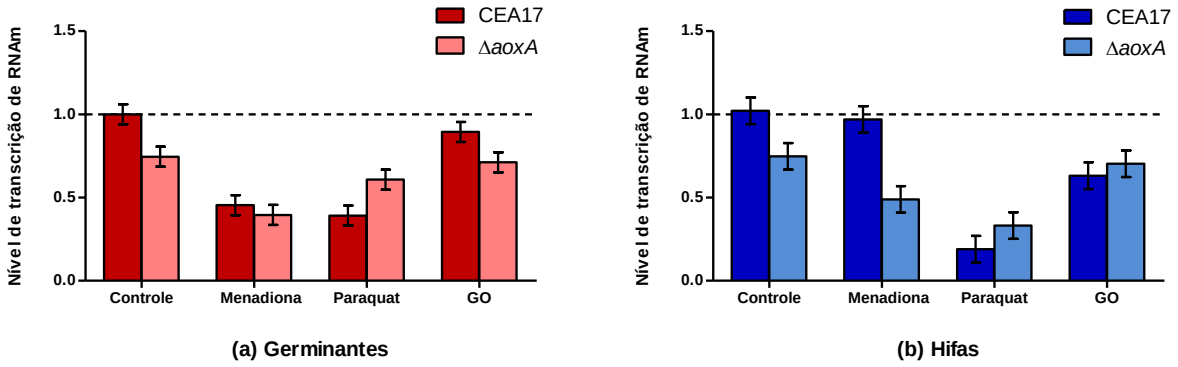


Figura 12 - Níveis de transcrição de *ndiA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.2.2 NADH desidrogenase alternativa externa (*nde*)

Diferentemente do observado em *ndiA*, as variações dos níveis de transcritos em germinantes e hifas, quando ocorreram em menadiona e paraquat, foram para valores superiores à CEA17 controle. Essas variações foram oriundas da interação cepa vs. tratamento (Tabela 11; Figura 13).

O nível de transcrição observado em germinantes de Δ*aoxA* sem tratamento (2 vezes) é superior ao CEA17 controle, o que não ocorre com a mesma condição em hifas. (Tabela 11).

Em germinantes de CEA17, menadiona foi o pró-oxidante que promoveu o maior aumento dos níveis de transcritos (4,23 vezes), seguido por paraquat (3,08 vezes) (Tabela 11; Figura 13a). Em Δ*aoxA* na mesma fase de desenvolvimento, paraquat foi o responsável pelo maior aumento (4,04 vezes), seguido por menadiona (1,95 vezes). O nível de transcrição de GO (1,22 vezes) foi inferior ao controle de Δ*aoxA* e de CEA17. Comparando-se os níveis obtidos em CEA17 e Δ*aoxA* na exposição à menadiona e paraquat observou-se diferença significativa entre o mesmo tratamento nas diferentes cepas (Tabela 11).

Tabela 11 - Níveis médios de transcrição de *nde* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [C; b]	2,00 [B; a]	1,02 [C; a]	2,09 [B; a]
Menadiona	4,23 [A; a]	1,95 [B; b]	19,21 [A; a]	14,01 [A; b]
Paraquat	3,08 [B; b]	4,04 [A; a]	4,33 [B; a]	2,62 [B; a]
GO	1,42 [C; a]	1,22 [C; a]	1,96 [BC; a]	2,33 [B; a]
EP	0,17	0,17	0,74	0,74

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

O aumento observado em hifas tratadas com menadiona foi maior que o observado em germinantes (Figura 13), sendo este pró-oxidante responsável pelos maiores níveis de transcritos obtidos para *nde*. Hifas de CEA17 atingiram níveis de 19,21 vezes, superiores ao observado nas mesmas condições em Δ*aoxA* (14,01 vezes) (Tabela 11; Figura 13b). Paraquat também aumentou a transcrição em 4,33

vezes para CEA17 e 2,62 vezes para Δ*aoxA*, sendo ambos os valores significativamente semelhantes.

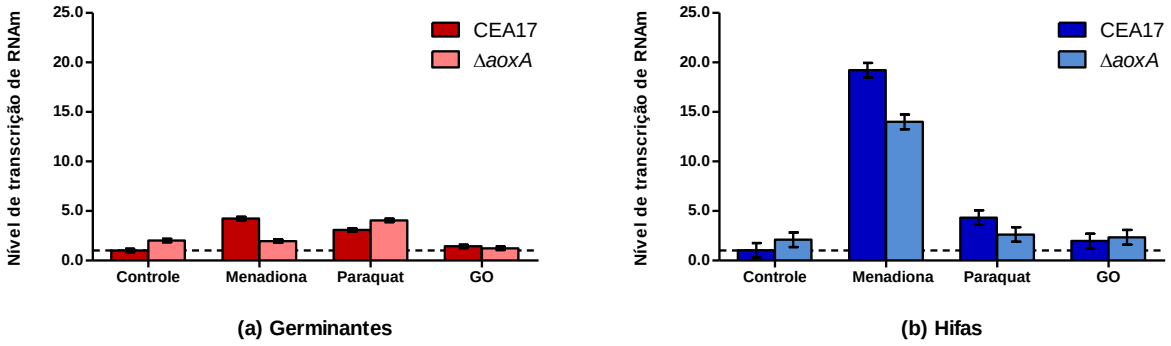


Figura 13 - Níveis de transcrição de *nde* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.2.3 Oxidase Alternativa (*aoxA*)

A exposição aos diferentes pró-oxidantes influenciou de modo significativo os níveis de transcrição de *aoxA* em CEA17 (Tabela 12). Em germinantes, paraquat promoveu o maior aumento desses níveis (7,38 vezes) (Tabela 12; Figura 14a). Menadiona e GO não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle nessa fase de desenvolvimento.

O tratamento de hifas com menadiona aumentou 56,29 vezes os níveis de transcritos, sendo este o maior nível obtido em todas as análises realizadas com as 23 enzimas estudadas. Os aumentos proporcionados por GO (5,69 vezes) e paraquat (4,71 vezes) não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 12; Figura 14b).

Tabela 12 - Níveis médios de transcrição de *aoxA* em germinantes e hifas, por tratamento.

	Germinantes	Hifas
Tratamento	CEA17[1]	CEA17[1]
Controle	1,00 [B]	1,01 [C]
Menadiona	2,33 [B]	56,29 [A]
Paraquat	7,38 [A]	4,71 [B]
GO	2,29 [B]	5,69 [B]
EP	0,40	0,55

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

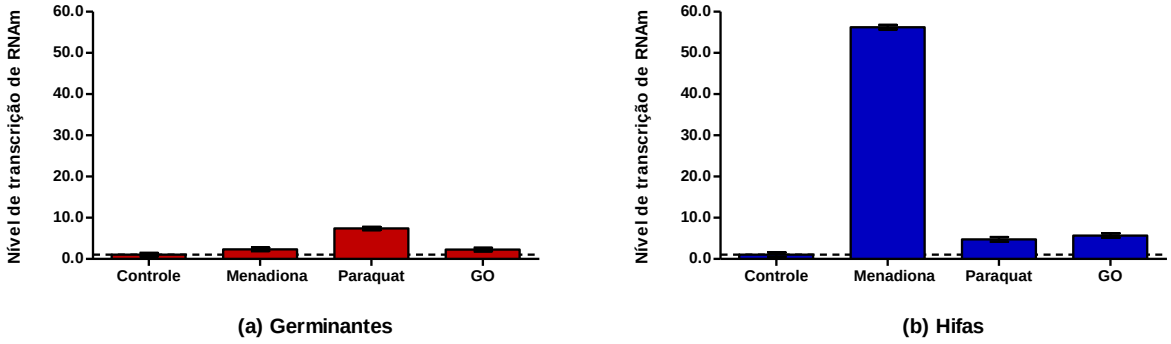


Figura 14 - Níveis de transcrição de *aoxA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepa CEA17, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.2.4 Proteína UCP-*like* (*ucp*)

ucp apresentou diferentes respostas às variáveis estudadas de acordo com as fases de desenvolvimento. Em germinantes, os níveis de transcritos foram influenciados pela interação cepa vs. tratamento (Tabela 13), enquanto que em hifas apenas os efeitos dos tratamentos nos resultados foram significativos (Tabela 14).

O tratamento com paraquat foi o único a promover aumento significativo dos níveis de transcritos de *ucp* (2,40 vezes) em germinantes de CEA17 (Tabela 13,

Figura 15). Em Δ*aoxA*, tanto menadiona (2,99 vezes) quanto paraquat (2,85 vezes) proporcionaram níveis superiores ao controle. GO não promoveu variação significativa de transcritos em nenhuma das cepas estudadas (Tabela 13, Figura 15).

Tabela 13 - Níveis médios de transcrição de *ucp* em germinantes, por tratamento e por cepa.

	Cepas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,01 [B; a]	0,72 [B; a]
Menadiona	1,47 [B; b]	2,99 [A; a]
Paraquat	2,40 [A; a]	2,85 [A; a]
GO	1,10 [B; a]	1,10 [B; a]
EP	0,19	0,19

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

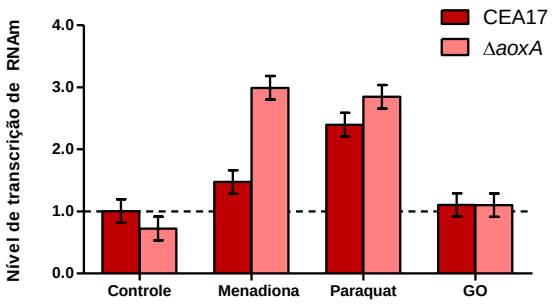


Figura 15 - Níveis de transcrição de *ucp* em germinantes de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos a diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Como observado em *aoxA*, menadiona também promoveu em hifas os maiores níveis de transcritos de *ucp* (9,26 vezes) em CEA17 e Δ*aoxA* (Tabela 14,

Figura 16). Nenhum outro tratamento proporcionou valores de transcritos diferentes do controle (Tabela 14).

Tabela 14 - Níveis médios de transcrição de *ucp* em hifas, por tratamento.

Tratamento	Hifas[1]
Controle	1,01 B
Menadiona	9,26 A
Paraquat	0,81 B
GO	1,03 B
EP	0,32

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

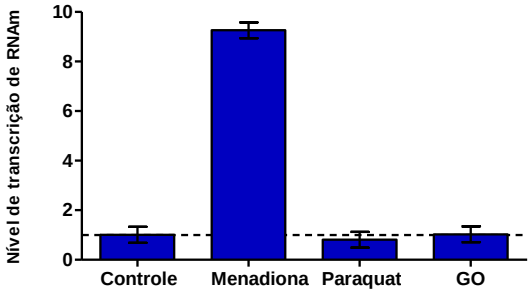


Figura 16 - Níveis de transcrição de *ucp* em hifas de *A. fumigatus*, expostas aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3 Componentes do sistema antioxidante

4.3.3.1 Superóxido dismutase 1 (*sod1*)

Os efeitos da interação cepa vs. tratamento nos níveis de transcritos de *sod1* foram significativos (Tabela 15).

As amostras de Δ*aoxA* sem tratamento não apresentaram variação de transcrição em relação à CEA17 controle em ambas as fases de desenvolvimento.

Porém, o nível de transcritos em germinantes de CEA17 variou para o tratamento com menadiona (5,25 vezes) e paraquat (2,97 vezes), ambos superiores ao controle (Tabela 15; Figura 17a). Em Δ*aoxA*, somente menadiona proporcionou variações desses níveis (5,86 vezes).

Em hifas, apenas paraquat foi responsável por variações na transcrição de *sod1*. Em CEA17 o nível de transcrição (2,04 vezes) foi superior ao controle, enquanto que em Δ*aoxA*, o nível atingido (0,42 vezes) foi inferior (Tabela 15; Figura 17b).

Tabela 15 - Níveis médios de transcrição de *sod1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	0,99 [C; a]	1,11 [B; a]	1,01 [B; a]	0,94 [B; a]
Menadiona	5,25 [A; a]	5,86 [A; a]	0,98 [B; b]	1,60 [B; a]
Paraquat	2,97 [B; a]	1,69 [B; b]	2,04 [A; a]	0,42 [C; b]
GO	1,50 [C; a]	1,37 [B; a]	0,78 [B; a]	0,99 [B; a]
EP	0,25	0,25	0,07	0,07

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

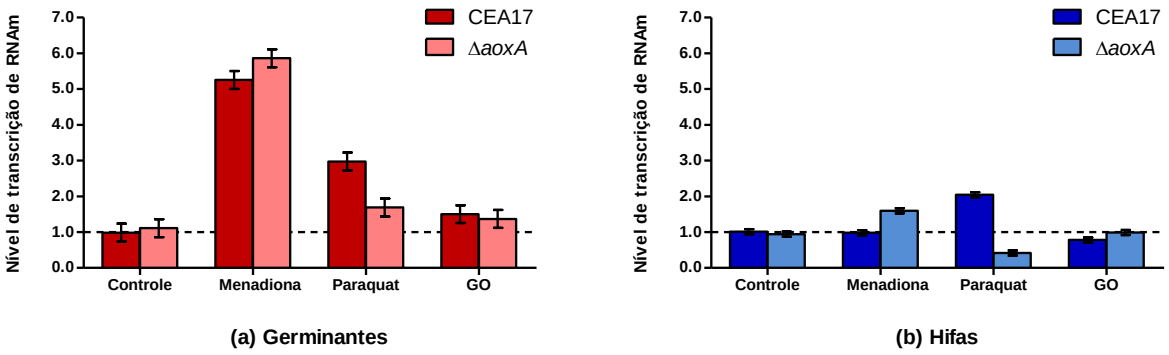


Figura 17 - Níveis de transcrição de *sod1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.2 Superóxido dismutase 2 (*sod2*)

Como em *sod1*, *sod2* também não apresentou variação significativa de seus transcritos em Δ*aoxA* controle em relação à CEA17 controle em ambas as fases de desenvolvimento, tendo a interação cepa vs. tratamento influenciado significativamente ($P < 0,05$) as variações observadas (Tabela 16).

A atividade de paraquat promoveu, em germinantes, aumento dos níveis de transcritos em CEA17 (9,71 vezes), superior ao observado em Δ*aoxA* (4,43 vezes) (Tabela 16, Figura 18a). Menadiona também proporcionou aumentos dos transcritos em CEA17 (6,46 vezes), inferior ao nível atingido por paraquat na mesma cepa, e Δ*aoxA* (6,20 vezes). Nenhuma variação significativa foi causada por GO.

Em hifas, o maior nível de transcritos foi promovido pelo tratamento de Δ*aoxA* com menadiona (7,50 vezes) (Tabela 16, Figura 18b). Este pró-oxidante também aumentou os níveis de CEA17 (3,47 vezes), semelhante ao obtido com a exposição da mesma cepa ao paraquat (3,38 vezes). A presença de GO não gerou variações significativas em nenhuma das cepas, bem como de paraquat em Δ*aoxA*.

Tabela 16 - Níveis médios de transcrição de *sod2* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,05 [C; a]	0,79 [B; a]	1,01 [B; a]	0,79 [B; a]
Menadiona	6,46 [B; a]	6,20 [A; a]	3,47 [A; b]	7,50 [A; a]
Paraquat	9,71 [A; a]	4,43 [A; b]	3,38 [A; a]	1,87 [B; a]
GO	1,04 [C; a]	1,08 [B; a]	1,66 [AB; a]	2,43 [B; a]
EP	0,51	0,51	0,53	0,53

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

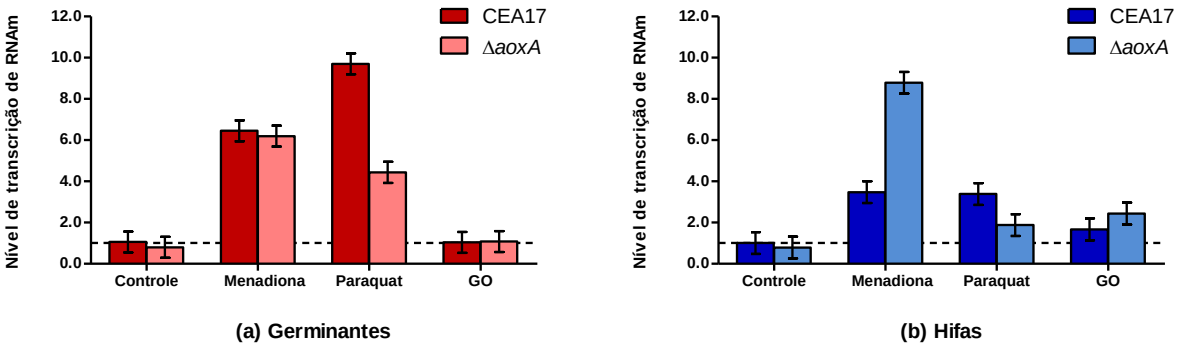


Figura 18 - Níveis de transcrição de *sod2* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.3 Superóxido dismutase 3 (*sod3*)

As variações observadas nos níveis de transcrição de *sod3* foram influenciadas pelos efeitos da interação cepa vs. tratamento, os quais foram significativos (Tabela 17).

Menadiona promoveu apenas diminuição dos níveis de transcritos em germinantes de ambas as cepas; em CEA17, o valor foi inferior ao observado em Δ*aoxA* (0,14 vezes e 0,54 vezes, respectivamente) (Tabela 17; Figura 19a). Paraquat, por sua vez, aumentou os níveis de transcritos de CEA17 (1,76 vezes) em relação ao controle e de Δ*aoxA* (0,92 vezes) em relação ao controle desta mesma cepa (0,13 vezes), sendo este último inferior ao controle de CEA17.

Tabela 17 - Níveis médios de transcrição de *sod3* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,11 [B; a]	0,13 [B; b]	1,00 [B; a]	0,82 [B; a]
Menadiona	0,14 [C; b]	0,54 [AB; a]	8,80 [A; a]	4,63 [A; b]
Paraquat	1,76 [A; a]	0,92 [A; b]	1,61 [B; a]	0,98 [B; b]
GO	0,61 [BC; a]	0,45 [AB; a]	1,10 [B; a]	1,21 [B; a]
EP	0,12	0,12	0,62	0,62

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Em hifas, menadiona foi o único pró-oxidante a promover aumento nos níveis de transcritos de *sod3* em ambas as cepas. Em CEA17, a transcrição atingiu níveis de 8,80 vezes, enquanto que em Δ*aoxA*, atingiu 4,63 vezes (Tabela 17; Figura 19b). Nenhum outro pró-oxidante foi responsável por variações significativas de transcritos em relação à CEA17 controle.

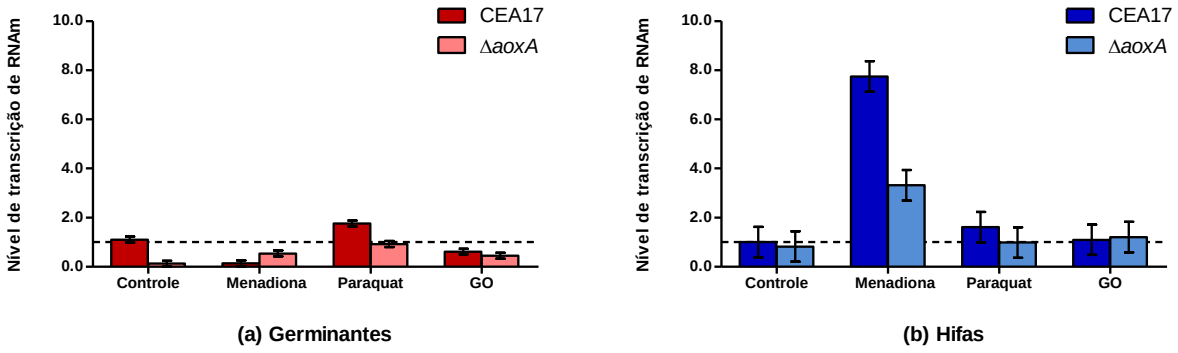


Figura 19 - Níveis de transcrição de *sod3* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.4 Superóxido dismutase Cu,Zn (*Cu,Znsod*)

A interação cepa vs. tratamento foi responsável pelas diferenças nos níveis de transcritos observados em *Cu,Znsod*. A análise de Δ*aoxA* sem tratamento também levou à observação de que, em ambas as fases de desenvolvimento, os níveis de transcritos foram inferiores à CEA17 controle (Tabela 18).

Menadiona foi o único pró-oxidante a proporcionar variação dos níveis de transcrição de *Cu,Znsod* em germinantes, atingindo 1,88 vezes em Δ*aoxA* (Tabela 18; Figura 20a). Em CEA17, os níveis obtidos não se mostraram diferentes ao controle da mesma fase de desenvolvimento com nenhum pró-oxidante testado.

Em hifas, os pró-oxidantes levaram à diminuição dos transcritos em relação ao controle (Tabela 18). Em CEA17, paraquat e GO proporcionaram essa diminuição (0,38 vezes e 0,34 vezes, respectivamente), enquanto que em Δ*aoxA*, menadiona (0,37 vezes) e paraquat (0,38 vezes) foram os responsáveis pelas variações dos transcritos (Tabela 18; Figura 20b). Todos esses valores são semelhantes entre si.

Tabela 18 - Níveis médios de transcrição de *Cu,Znsod* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,03 [A; a]	0,43 [B; b]	1,00 [A; a]	0,69 [A; b]
Menadiona	1,01 [A; b]	1,88 [A; a]	0,90 [A; a]	0,37 [B; b]
Paraquat	0,73 [A; a]	0,60 [B; a]	0,38 [B; a]	0,38 [B; a]
GO	0,83 [A; a]	0,58 [B; a]	0,34 [B; b]	0,62 [AB; a]
EP	0,14	0,14	0,06	0,06

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

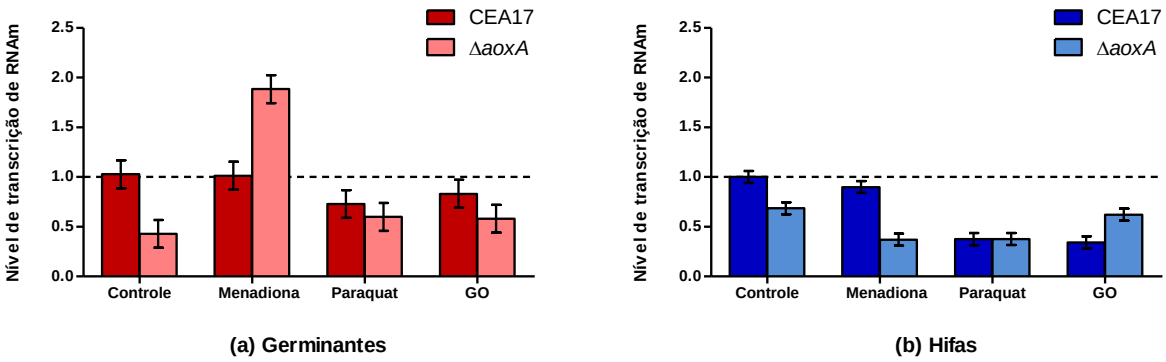


Figura 20 - Níveis de transcrição de *Cu,Znsod* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.5 Catalase micelial (*cat1*)

A influência das variáveis testadas no estudo de níveis de transcrição foi diferente de acordo com a fase de desenvolvimento de *A. fumigatus*. Em germinantes, somente os efeitos do tratamento foram significativos (Tabela 19); em

hifas, a interação cepa vs. tratamento foi responsável pelas variações observadas (Tabela 20).

Em germinantes, os níveis de transcrição de *cat1* nos tratamentos com menadiona (10,17 vezes) e paraquat (11,51 vezes) foram superiores aos do controle e do obtido com GO em ambas as cepas (Tabela 19; Figura 21). Eles também foram superiores a todos os níveis observados hifas.

Tabela 19 - Níveis médios de transcrição de *cat1* em germinantes, por tratamento.

Tratamento	Germinantes[1]
Controle	0,82 [B]
Menadiona	10,17 [A]
Paraquat	11,51 [A]
GO	1,46 [B]
EP	0,57

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

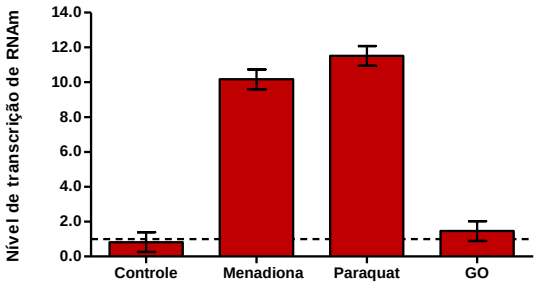


Figura 21 - Níveis de transcrição de *cat1* em germinantes de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Tabela 20 - Níveis médios de transcrição de *cat1* em hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,03 [A; b]	1,36 [B; a]
Menadiona	0,21 [B; a]	0,37 [C; a]
Paraquat	0,24 [B; b]	1,94 [A; a]
GO	0,74 [A; a]	0,35 [C; b]
EP	0,09	0,09

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

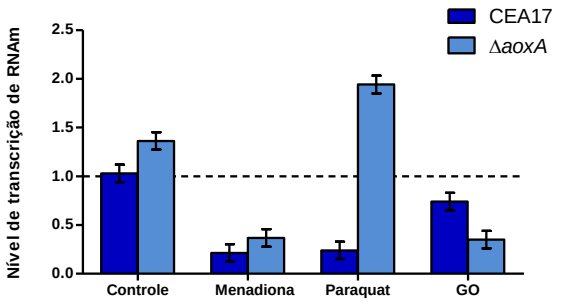


Figura 22 - Níveis de transcrição de *cat1* em hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Paraquat aumentou os níveis de transcritos para 1,94 vezes em hifas de Δ*aoxA* e os diminuiu para 0,24 vezes em CEA17 (Tabela 20; Figura 22). Menadiona teve atividade semelhante ao diminuir para 0,21 vezes os níveis em CEA17, mas em Δ*aoxA* os níveis obtidos (0,37 vezes) foram inferiores aos do tratamento com paraquat e aos do controle da mesma cepa e semelhantes ao tratamento com GO.

Vale ressaltar que os níveis de Δ*aoxA* controle (1,36 vezes) foram superiores aos observados no controle de CEA17.

4.3.3.6 Catalase peroxidase bifuncional (*cat2*)

Os níveis de transcritos observados para *cat2* foram influenciados significativamente pela interação cepa vs. tratamento (Tabela 21). Dentre os controles, não houve variação significativa em nenhuma das fases de desenvolvimento. Entretanto, hifas tratadas com menadiona e paraquat foram as condições analisadas que atingiram os maiores níveis de transcritos (Tabela 21; Figura 23).

Tabela 21 - Níveis médios de transcrição de *cat2* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,02 [B; a]	0,52 [B; a]	1,02 [C; a]	0,89 [B; a]
Menadiona	1,47 [B; b]	2,60 [A; a]	6,87 [A; a]	6,91 [A; a]
Paraquat	2,20 [A; a]	2,38 [A; a]	3,65 [B; b]	8,76 [A; a]
GO	1,08 [B; a]	0,69 [B; a]	0,70 [C; a]	0,55 [B; a]
EP	0,13	0,13	0,48	0,48

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Hifas da cepa Δ*aoxA* expostas ao paraquat apresentaram níveis (8,76 vezes) superiores ao observado para CEA17 com o mesmo tratamento (3,65 vezes) e ao controle (Tabela 21; Figura 23b). Valores semelhantes foram observados para

Δ*aoxA* (6,87 vezes) e CEA17 (6,91 vezes) tratadas com menadiona, sendo que este último é superior ao obtido com a mesma cepa tratada com paraquat.

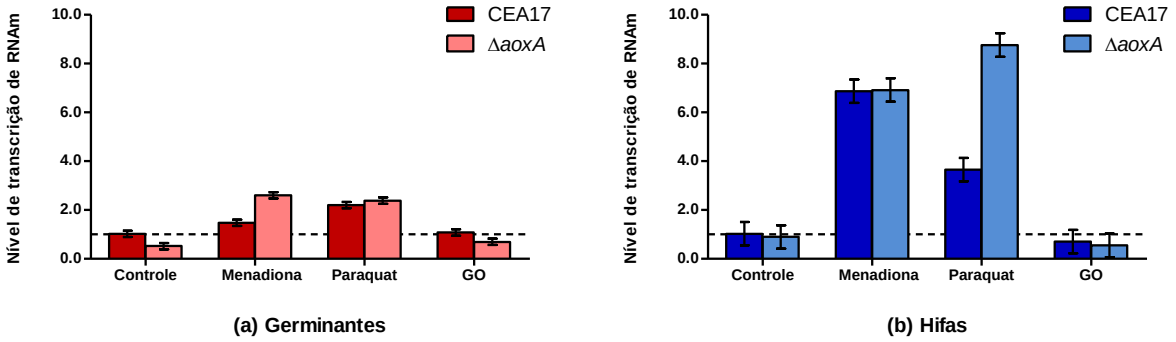


Figura 23 - Níveis de transcrição de *cat2* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Em germinantes, somente paraquat promoveu aumento dos níveis de transcritos em CEA17 (2,20 vezes). Em Δ*aoxA*, esse aumento foi observado nos tratamentos com paraquat (2,38 vezes) e menadiona (2,60 vezes), todos valores semelhantes entre si (Tabela 21; Figura 23a).

4.3.3.7 Catalase esporo-específica (*catA*)

A interação cepa vs. tratamento influenciou significativamente os níveis de transcritos de *catA* (Tabela 22).

Os transcritos dos controles de germinantes e hifas em Δ*aoxA* não apresentaram variação significativa em relação aos respectivos controles em CEA17. Os tratamentos com menadiona e paraquat, por sua vez, foram os pró-oxidantes que promoveram as maiores variações em ambas as fases de desenvolvimento do fungo (Tabela 22).

Tabela 22 - Níveis médios de transcrição de *catA* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 B; a	1,38 C; a	1,00 **C; a**	3,04 **B; a**
Menadiona	3,08 AB; b	16,96 A; a	5,04 **B; b**	9,82 **A; a**
Paraquat	3,77 A; b	5,66 B; a	13,82 **A; a**	7,44 **A; b**
GO	2,13 AB; a	1,02 C; a	3,51 **BC; a**	3,00 **B; a**
EP	0,45	0,45	0,82	0,82

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Menadiona aumentou em germinantes de Δ*aoxA* 16,96 vezes os níveis de transcritos e em CEA17, aumentou 3,08, não sendo este valor superior ao controle da mesma cepa (Tabela 22; Figura 24a). Paraquat promoveu aumento significativo tanto em CEA17 (3,77 vezes) quanto em Δ*aoxA* (5,66 vezes), sendo estes diferentes entre si.

Em hifas, o maior aumento foi promovido por paraquat em CEA17 (13,82 vezes), e por menadiona ou paraquat (9,82 vezes e 7,44 vezes, respectivamente) em Δ*aoxA* (Tabela 22; Figura 24b). Menadiona proporcionou um maior aumento nos níveis de transcritos em Δ*aoxA* (9,82 vezes) do que em CEA17 (5,04 vezes).

GO não promoveu alterações significativas nos níveis de transcritos em nenhuma das fases de desenvolvimento estudadas (Tabela 22).

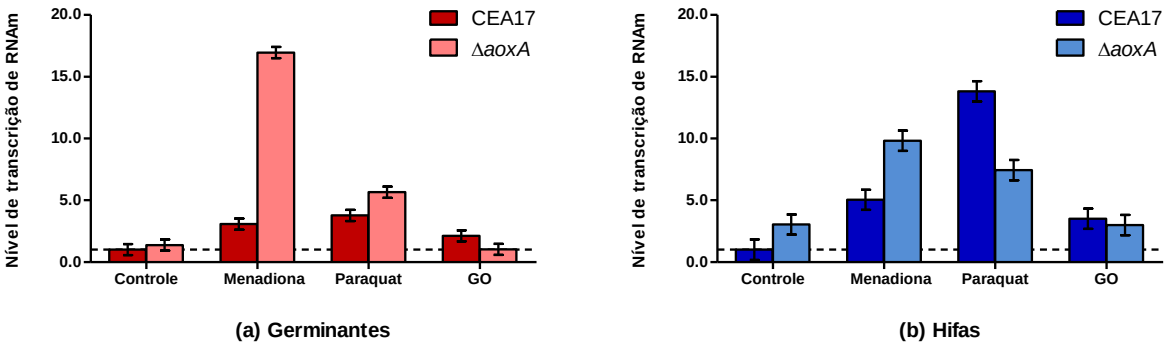


Figura 24 - Níveis de transcrição de *catA* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.8 Citocromo C peroxidase (*ccp1*)

Na análise de transcritos de ccp1 foram observados apenas aumentos de seus níveis e os efeitos da interação cepa vs. tratamento foram significativos (Tabela 23).

Tabela 23 - Níveis médios de transcrição de *ccp1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,01 [B; a]	1,14 [B; a]	1,00 [B; b]	1,48 [C; a]
Menadiona	2,31 [A; a]	1,84 [B; a]	1,65 [A; b]	2,93 [A; a]
Paraquat	2,36 [A; b]	4,04 [A; a]	1,35 [AB; b]	2,38 [B; a]
GO	0,95 [B; a]	1,28 [B; a]	1,05 [B; a]	1,19 [C; a]
EP	0,21	0,21	0,09	0,09

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

O nível de transcrito de Δ*aoxA* controle foi superior ao de CEA17 somente em hifas (1,48 vezes) (Tabela 23). A exposição de Δ*aoxA* germinantes ao paraquat promoveu o maior aumento observado para *ccp1* (4,04 vezes), superior ao obtido com o mesmo tratamento em CEA17 (2,36 vezes) (Tabela 23; Figura 25a). A exposição à menadiona foi responsável somente pelo aumento dos níveis de transcritos de CEA17 (2,31 vezes). GO não promoveu nenhuma variação significativa nos níveis de transcritos de *ccp1*.

Em hifas, menadiona promoveu aumento dos transcritos em Δ*aoxA* (2,93 vezes) e CEA17 (1,65 vezes) (Tabela 23; Figura 25b). Paraquat também foi responsável pelo aumento dos níveis de transcritos, que atingiram 2,38 vezes em Δ*aoxA*. Este nível é superior ao obtido com o mesmo tratamento em CEA17 e inferior ao observado no tratamento de Δ*aoxA* com menadiona. GO novamente não promoveu alterações significativas nos níveis de transcritos em hifas.

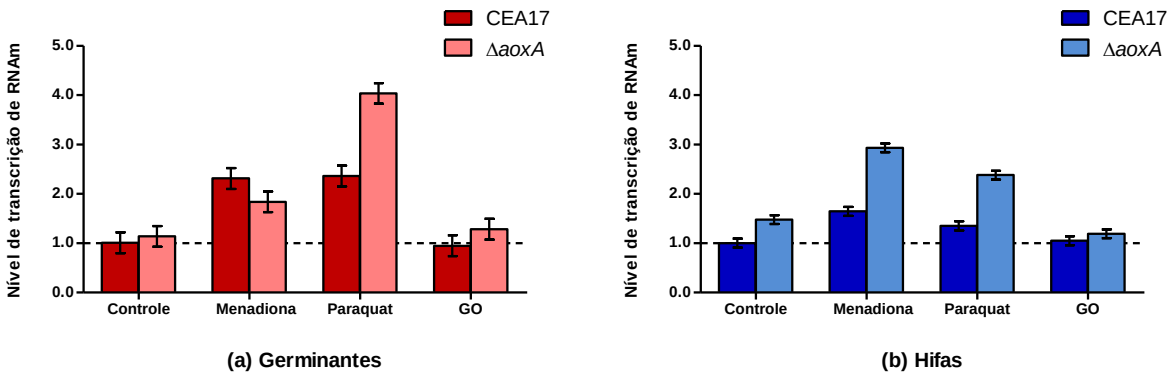


Figura 25 - Níveis de transcrição de *ccp1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.9 Peroxirredoxina (*prx1*)

Prx1 foi mais uma enzima que não apresentou variação significativa de seus transcritos entre os controles das diferentes cepas nas mesmas fases de desenvolvimento e que a interação cepa vs. tratamento influenciou de modo significativo os resultados obtidos (Tabela 24).

Em germinantes, os níveis de transcritos atingiram valores menores que em hifas. Menadiona proporcionou aumento desses níveis em Δ*aoxA* (1,67 vezes) (Tabela 24; Figura 26a). Valores semelhantes foram obtidos com o tratamento da mesma cepa (1,42 vezes) e de CEA17 (1,53 vezes) com paraquat.

Em hifas, menadiona foi responsável pelo maior aumento dos níveis de transcritos (3,39 vezes) quando Δ*aoxA* foi exposto a este pró-oxidante (Tabela 24; Figura 26b). Em CEA17 este tratamento promoveu aumento de 2,48 vezes, superior ao obtido com os outros tratamentos na mesma cepa.

Tabela 24 - Níveis médios de transcrição de *prx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [B; a]	0,87 [B; a]	1,01 [C; a]	1,25 [C; a]
Menadiona	1,25 [AB; b]	1,67 [A; a]	2,48 [A; b]	3,39 [A; a]
Paraquat	1,53 [A; a]	1,42 [A; a]	1,50 [B; b]	2,27 [B; a]
GO	0,98 [B; a]	0,71 [B; a]	1,72 [B; a]	1,66 [C; a]
EP	0,11	0,11	0,16	0,16

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

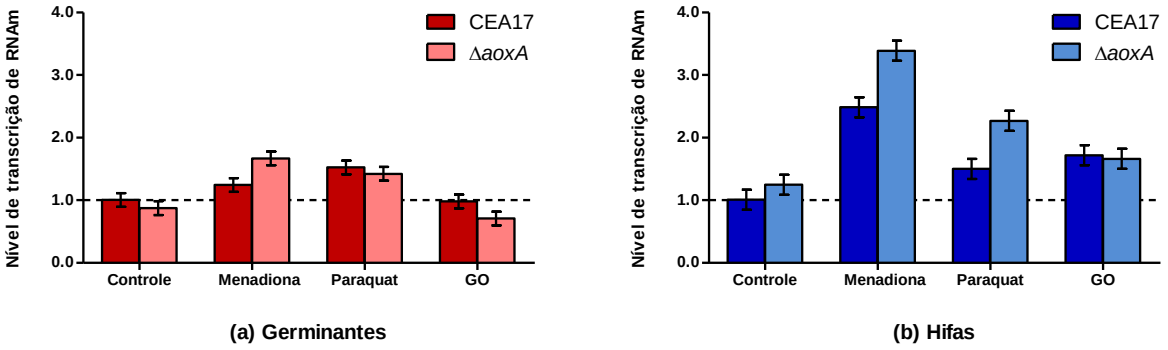


Figura 26 - Níveis de transcrição de *prx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

O tratamento com paraquat aumentou os transcritos de *prx1* em hifas de Δ*aoxA* (2,27 vezes) e em CEA17 (1,50 vezes), níveis significativamente menores que os obtidos com menadiona e diferentes entre si. O nível de transcrição obtido com GO foi superior ao controle somente em hifas de CEA17 (1,72 vezes), sendo este semelhante ao obtido com paraquat na mesma cepa.

4.3.3.10 Tiorredoxina (*trx1*)

A interação cepa vs. tratamento influenciou significativamente os níveis de transcrição de *trx1* (Tabela 25), os quais se mostraram maiores do que os observados em *prx1* (Tabela 24).

Germinantes apresentaram os maiores níveis de transcritos quando expostos à menadiona e ao paraquat. Em Δ*aoxA* exposta à menadiona, esses níveis (23,75 vezes) foram superiores aos de CEA17 (10,88 vezes) (Tabela 25; Figura 27a). Com paraquat, o aumento observado para CEA17 (14,77 vezes) foi semelhante ao obtido com Δ*aoxA* (12,53 vezes). A exposição à GO não promoveu

alterações significativas nos níveis de transcritos em nenhuma das cepas nesta fase de desenvolvimento.

Tabela 25 - Níveis médios de transcrição de *trx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [B; a]	1,15 [C; a]	1,00 [C; a]	1,02 [C; a]
Menadiona	10,88 [A; b]	23,75 [A; a]	5,96 [A; b]	8,87 [A; a]
Paraquat	14,77 [A; a]	12,53 [B; a]	2,11 [B; a]	1,95 [BC; a]
GO	1,75 [B; a]	2,29 [C; a]	0,89 [C; b]	2,24 [B; a]
EP	1,27	1,27	0,26	0,26

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

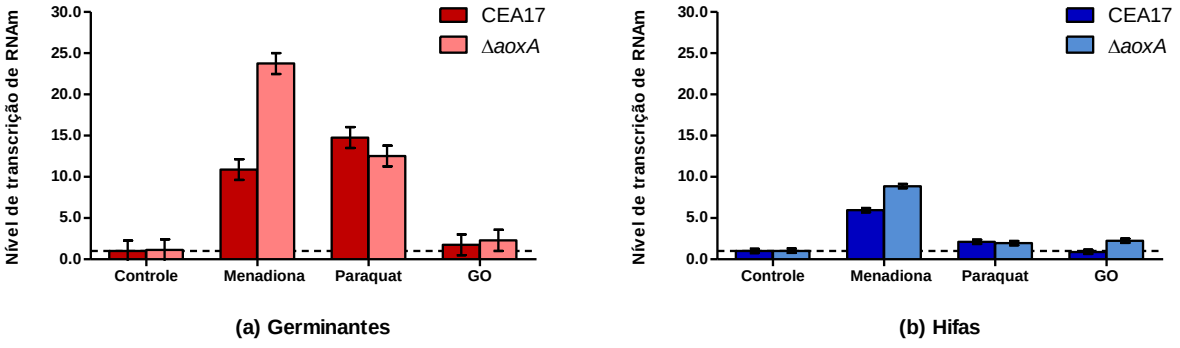


Figura 27 - Níveis de transcrição de *trx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Os maiores níveis de transcritos obtidos em hifas também foram com menadiona (8,87 vezes em ΔAOX, superior à CEA17 - 5,96 vezes) (Tabela 25; Figura 27b). Paraquat promoveu aumento de 2,11 vezes em CEA17 e 1,95 vezes em Δ*aoxA*. GO causou variação significativa em relação ao controle somente em Δ*aoxA*, aumentando para 2,24 vezes os níveis de transcritos.

4.3.3.11 Glutarredoxina (*grx1*)

Novamente os efeitos da interação cepa vs. tratamento foram significativamente responsáveis pelos resultados obtidos para *grx1* (Tabela 26).

Tabela 26 - Níveis médios de transcrição de *grx1* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,01 [A; a]	1,01 [B; a]	1,07 [B; a]	0,89 [B; a]
Menadiona	1,15 [A; b]	2,73 [A; a]	16,09 [A; a]	12,39 [A; b]
Paraquat	1,79 [A; a]	1,62 [AB; a]	0,83 [B; a]	1,24 [B; a]
GO	1,20 [A; a]	1,54 [AB; a]	1,64 [B; a]	2,27 [B; a]
EP	0,27	0,27	0,38	0,38

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

As diferenças nos níveis de transcrição de germinantes e hifas indicam respostas distintas aos pró-oxidantes de acordo com a fase de desenvolvimento avaliada. Em germinantes, houve aumento de 2,73 vezes apenas em Δ*aoxA* exposto

à menadiona, sendo este o único resultado significativo obtidos com os pró-oxidantes utilizados (Tabela 26; Figura 28a).

Em hifas, as variações mais significativas dos níveis de transcritos foram observadas apenas no tratamento com menadiona. Em CEA17 esses níveis (16,09 vezes) foram superiores aos obtidos em Δ*aoxA* (12,39 vezes). Estes foram os maiores aumentos em *grx1* e nenhum outro pró-oxidante promoveu variações significativas de transcritos.

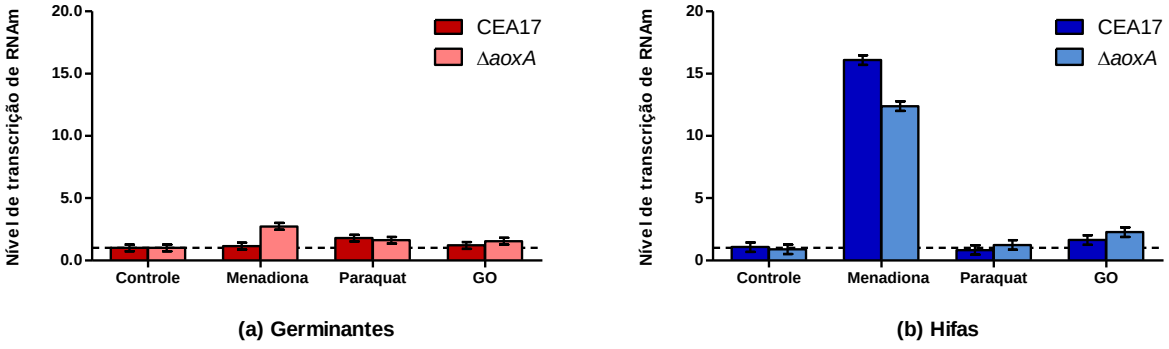


Figura 28 - Níveis de transcrição de *grx1* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.12 Glutationa redutase (*glr1*)

Os níveis de transcritos de *glr1* foram significativamente influenciados apenas pelos tratamentos realizados (Tabela 27). Observou-se também que hifas expostas à menadiona apresentaram os maiores aumentos de transcritos ao se comparar ambas as fases de desenvolvimento de *A. fumigatus*.

Em germinantes, os efeitos mais significativos foram obtidos com o paraquat (3,02 vezes) em ambas as cepas (Tabela 27; Figura 29a). Menadiona e GO apresentaram efeitos significativamente semelhantes.

Tabela 27 - Níveis médios de transcrição de *glr1* em germinantes e hifas, por tratamento.

Tratamento	Germinantes[1]	Hifas[1]
Controle	1,47 [B]	0,91 [B]
Menadiona	2,22 [AB]	4,22 [A]
Paraquat	3,02 [A]	1,65 [B]
GO	2,08 [AB]	1,12 [B]
EP	0,28	0,38

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

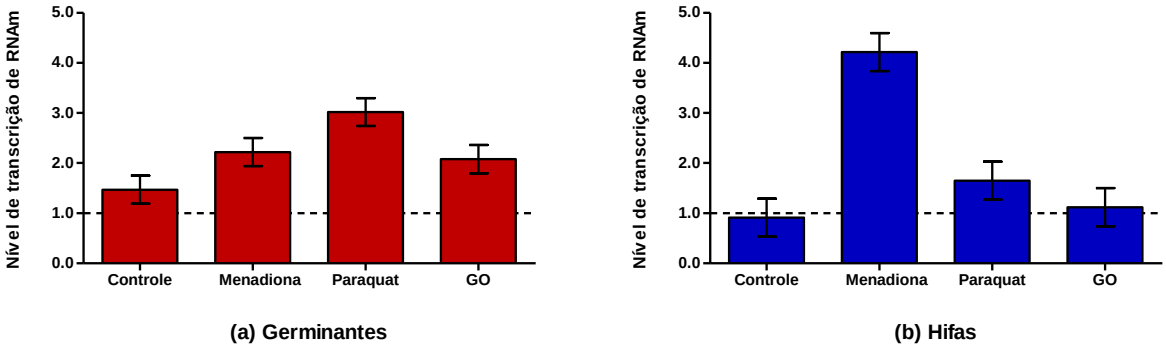


Figura 29 - Níveis de transcrição de *glr1*, em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Em hifas, os únicos níveis de transcritos significativamente alterados em relação ao controle foram os obtidos com menadiona (Tabela 27). Este tratamento aumentou os níveis de transcritos para 4,22 vezes em CEA17 e Δ*aoxA* (Tabela 27; Figura 29b).

4.3.3.13 Isocitrato desidrogenase (*idh*)

Os efeitos de cepa e tratamento nos níveis de transcritos de *idh* em germinantes foram significativos de modo independente (Tabelas 28 e 29). A interação entre eles foi significativa somente para hifas (Tabela 30).

Tabela 28 - Níveis médios de transcrição de *idh* em germinantes, por tratamento.

Tratamento	Germinantes[1]
Controle	0,89 [A]
Menadiona	0,72 [AB]
Paraquat	0,91 [A]
GO	0,56 [B]
EP	0,08

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

O nível de transcrição de germinantes expostos à GO (0,56 vezes) foi inferior ao controle e paraquat em CEA17 e Δ*aoxA* (Tabela 28, Figura 30a). Quanto às cepas, o nível de transcrição de CEA17 (0,93 vezes) foi superior ao de Δ*aoxA* (0,61 vezes) (Tabela 29; Figura 30b).

Tabela 29 - Níveis médios de transcrição de *idh* em germinantes, por cepa.

	Cepas	
	CEA17[2]	Δ*aoxA*[2]
	0,93 [a]	0,61 [b]
EP	0,05	0,05

[2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

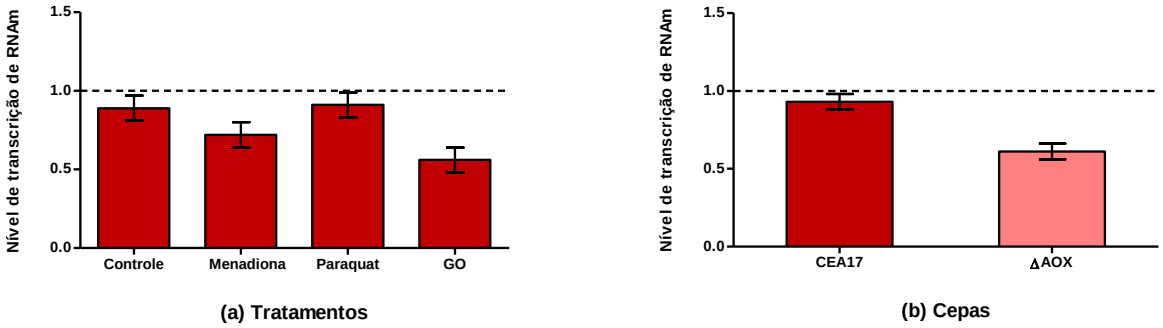


Figura 30 - Níveis de transcrição de *idh*, em germinantes de *A. fumigatus* de acordo com a exposição aos diferentes agentes pró-oxidantes (a) e as cepas (b). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

Tabela 30 - Níveis médios de transcrição de *idh* em hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,03 [B; a]	0,86 [B; a]
Menadiona	3,04 [A; a]	1,86 [A; b]
Paraquat	0,44 [C; b]	0,87 [B; a]
GO	0,67 [BC; a]	0,69 [B; a]
EP	0,11	0,09

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

Em hifas, o controle de Δ*aoxA* não variou significativamente em relação à CEA17 controle, bem como os níveis de transcritos obtidos com GO em Δ*aoxA* e CEA17 (Tabela 30). Menadiona aumentou 3,04 vezes os níveis em CEA17 e 1,86 vezes em Δ*aoxA*, sendo este último inferior ao nível observado para CEA17 (Tabela 30; Figura 31). Paraquat promoveu diminuição de 0,44 vezes em CEA17, sendo esta a única alteração significativa promovida por este tratamento.

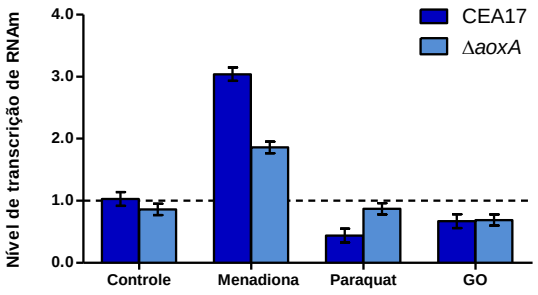


Figura 31 - Níveis de transcrição de *idh* em hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

4.3.3.14 Peptídeo RCI (*rci*)

Novamente a interação cepa vs. tratamento influenciou de modo significativo os níveis de transcritos obtidos para *rci*. Ao se analisar os controles de Δ*aoxA* em germinantes e hifas observou-se a ausência de diferenças significativas em relação aos controles de CEA17 da mesma fase de desenvolvimento celular (Tabela 31).

Todos os pró-oxidantes utilizados promoveram aumentos nos níveis de transcritos, porém de grandezas e em fases de desenvolvimento diferentes. Em germinantes, os níveis obtidos em CEA17 tratado com menadiona (14,49 vezes) foram superiores aos obtidos com Δ*aoxA* (11,02 vezes) exposta ao mesmo pró-oxidante (Tabela 31; Figura 32a). Em hifas, esses valores foram de 8,18 vezes para CEA17 e 17,21 vezes para Δ*aoxA*, o maior aumento de transcritos observado para *rci* (Tabela 31; Figura 32b).

Paraquat aumentou os níveis dos transcritos em germinantes de CEA17 (16,36 vezes), não variando significativamente do aumento promovido por menadiona nesta cepa, mas superior ao observado em Δ*aoxA* (6,15 vezes) (Tabela 31; Figura 32a). Em hifas, o aumento foi de 5,26 vezes em CEA17, inferior ao obtido

com menadiona, e 1,65 vezes em Δ*aoxA*, semelhante ao controle desta cepa (Tabela 31; Figura 32b).

Tabela 31 - Níveis médios de transcrição de *rci* em germinantes e hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas			
	Germinantes		Hifas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	1,00 [B; a]	1,17 [C; a]	1,01 [C; a]	1,18 [C; a]
Menadiona	14,49 [A; a]	11,02 [A; b]	8,18 [A; b]	17,21 [A; a]
Paraquat	16,36 [A; a]	6,15 [B; b]	5,26 [B; a]	1,65 [C; b]
GO	1,52 [B; a]	1,13 [C; a]	1,82 [C; b]	4,04 [B; a]
EP	0,99	0,99	0,43	0,43

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Valores foram normalizados a partir de *gapdh*.

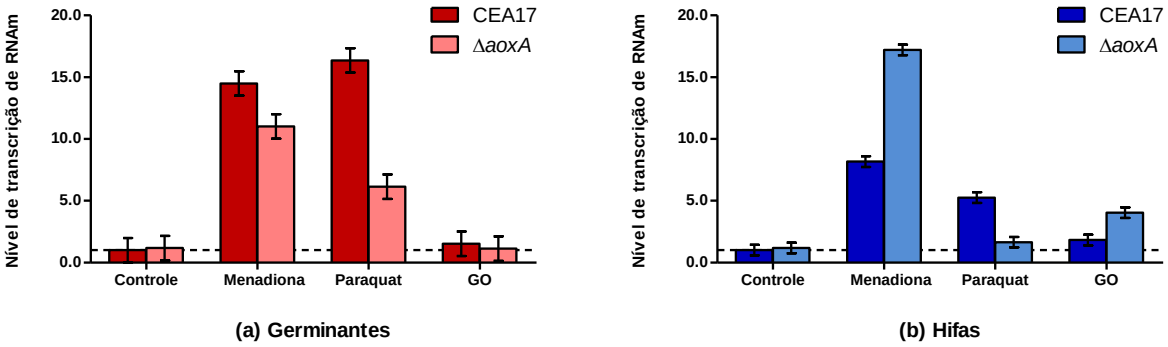


Figura 32 - Níveis de transcrição de *rci* em germinantes (a) e hifas (b) de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos aos diferentes agentes pró-oxidantes. Valores foram normalizados a partir de *gapdh*. A linha tracejada indica o nível do controle admitido como calibrador.

GO promoveu alteração significativa de transcritos somente em hifas de Δ*aoxA*, aumentando para 4,04 vezes seus níveis (Tabela 31; Figura 32b).

4.3.4 Níveis de transcrição em germinantes e hifas de *A. fumigatus* agrupados de acordo com suas funções e o pró-oxidante utilizado

O objetivo desta apresentação de resultados é o de tornar mais didática a visualização dos dados anteriormente descritos. Cada gráfico é composto por genes envolvidos em uma via funcional específica (CTE, componentes alternativos da CTE e compostos envolvidos no sistema antioxidante), separados por cepa (CEA17 e Δ*aoxA*). As figuras foram construídas agrupando-se os gráficos de acordo com o pró-oxidante utilizado (menadiona, paraquat e GO).

4.3.4.1 Germinantes expostos à menadiona

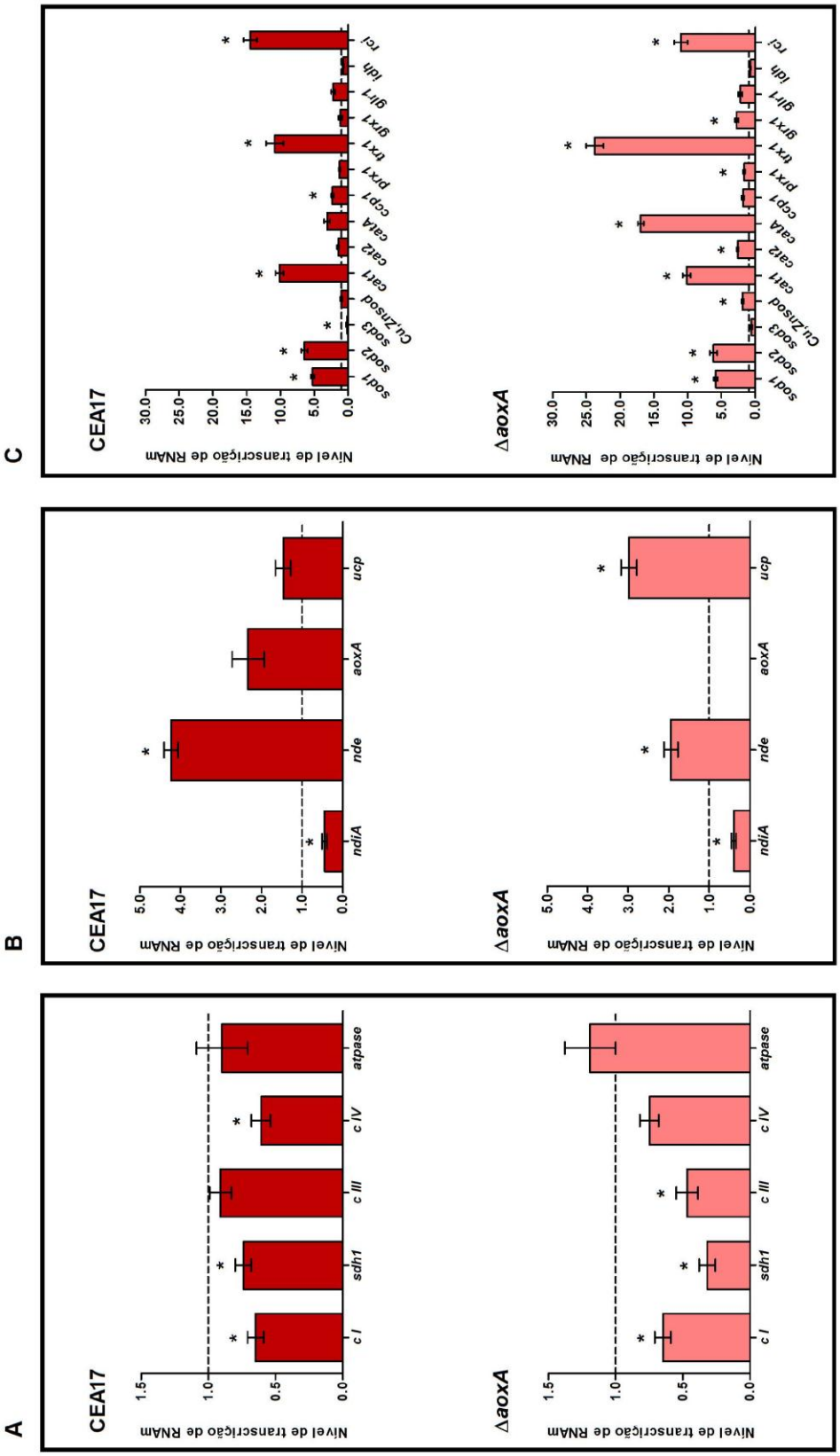


Figura 33 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à menadiona. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.3.4.2 Germinantes expostos ao paraquat

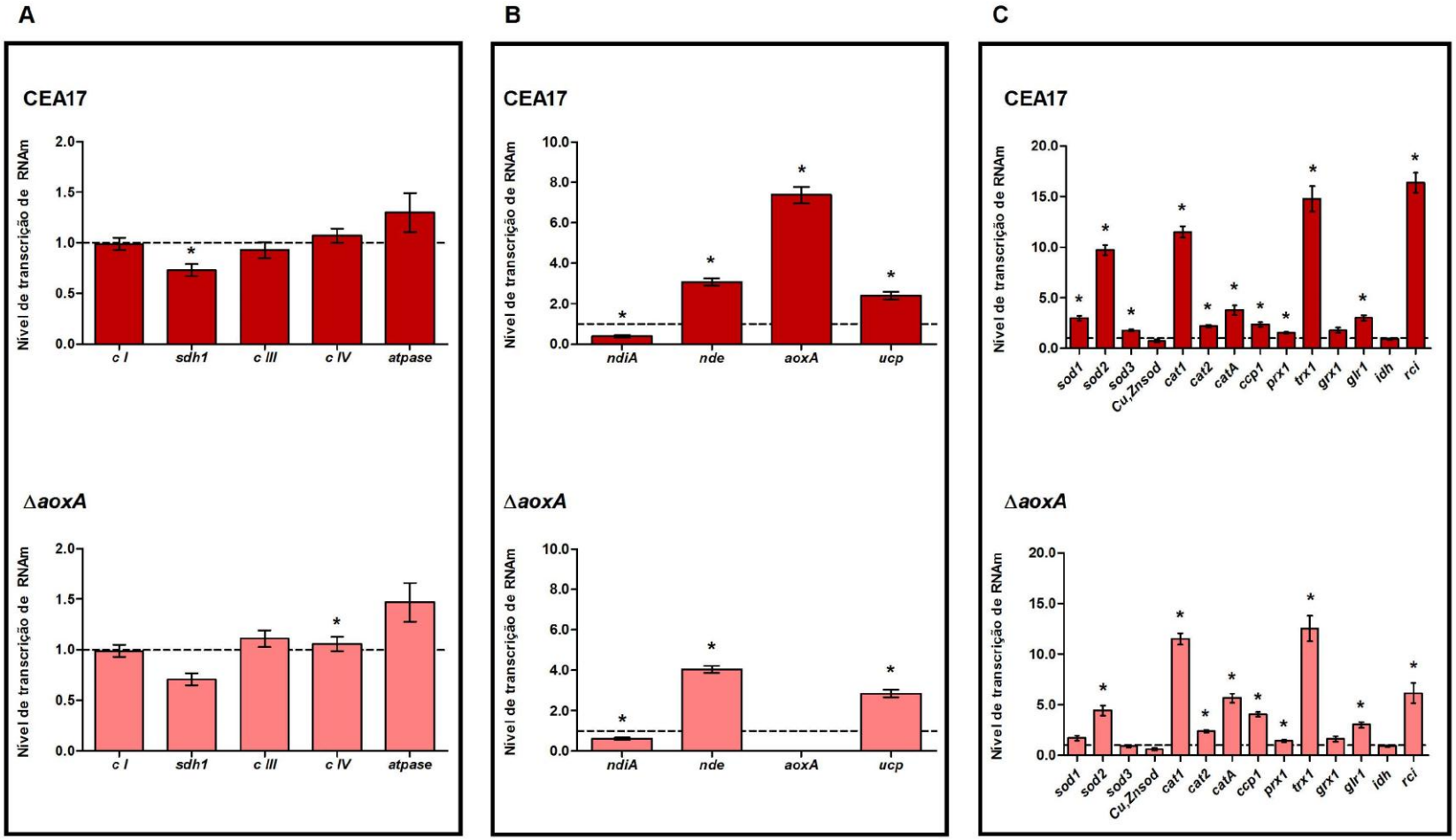


Figura 34 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos ao paraquat. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.3.4.3 Germinantes expostos à GO

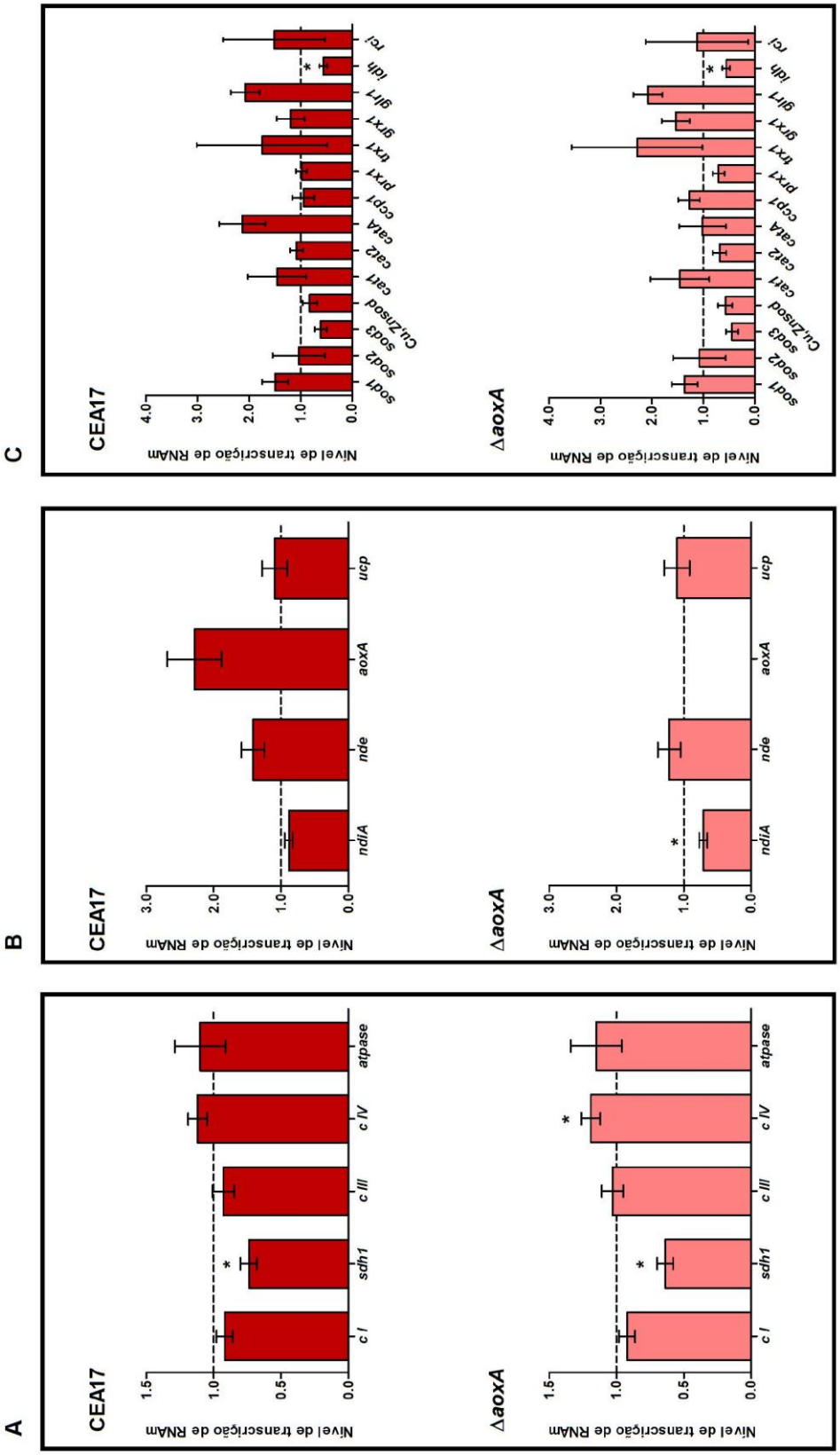


Figura 35 - Níveis de transcrição de germinantes de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à GO. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.3.4.4 Hifas expostas à menadiona

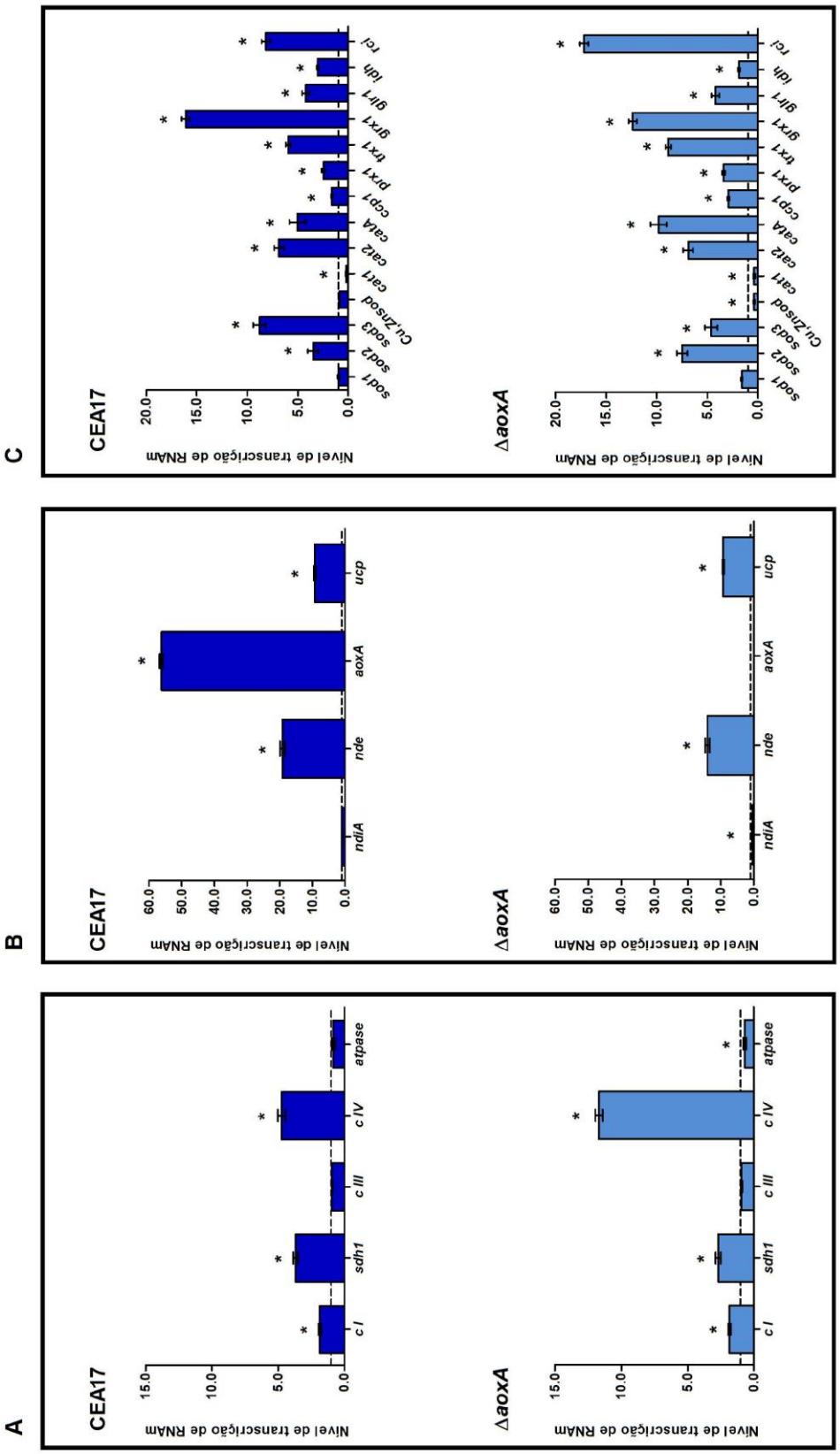


Figura 36 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas à menadiona. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.3.4.5 Hifas expostas ao paraquat

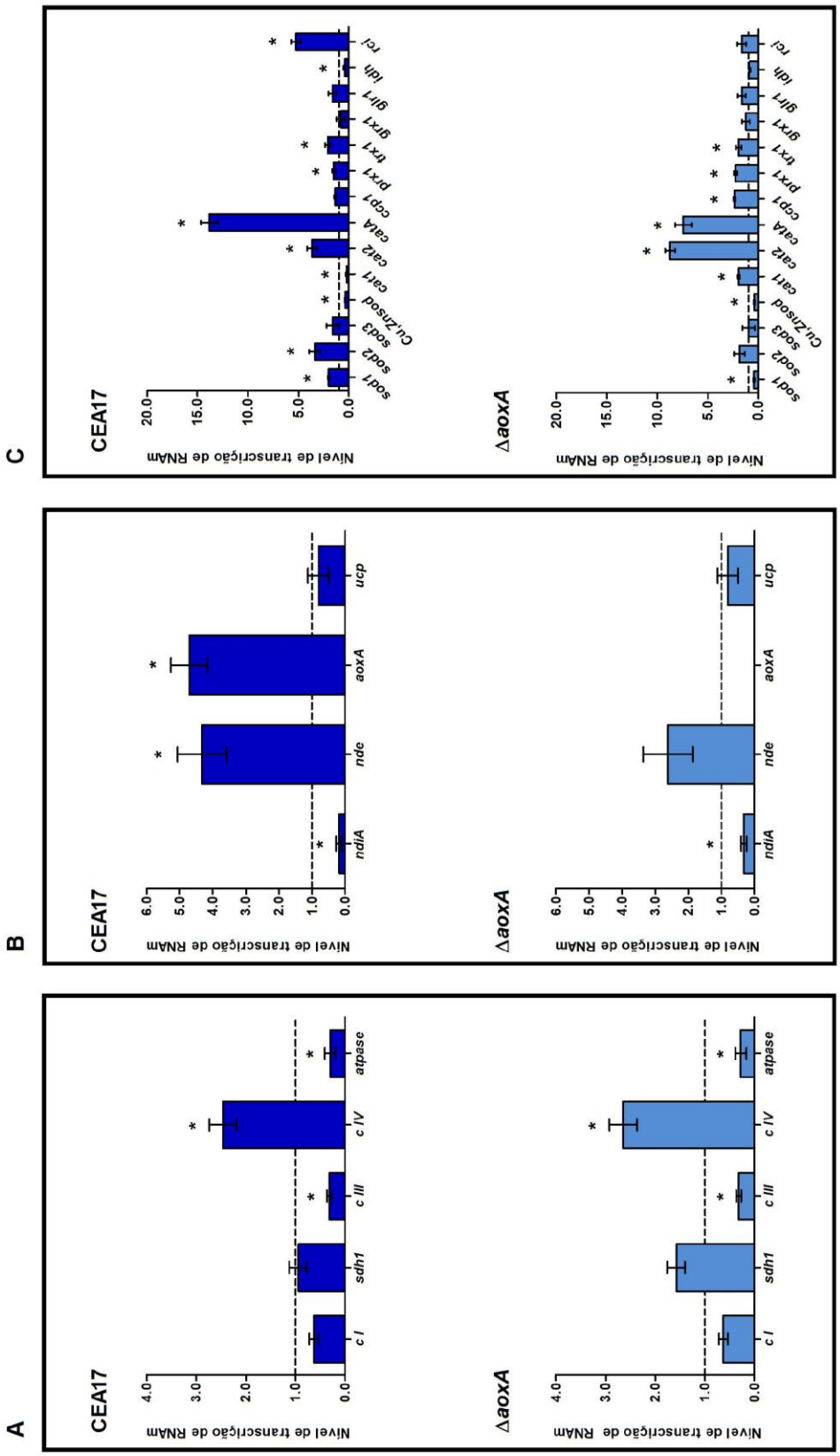


Figura 37 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas ao paraquat. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.3.4.6 Hifas expostas à GO

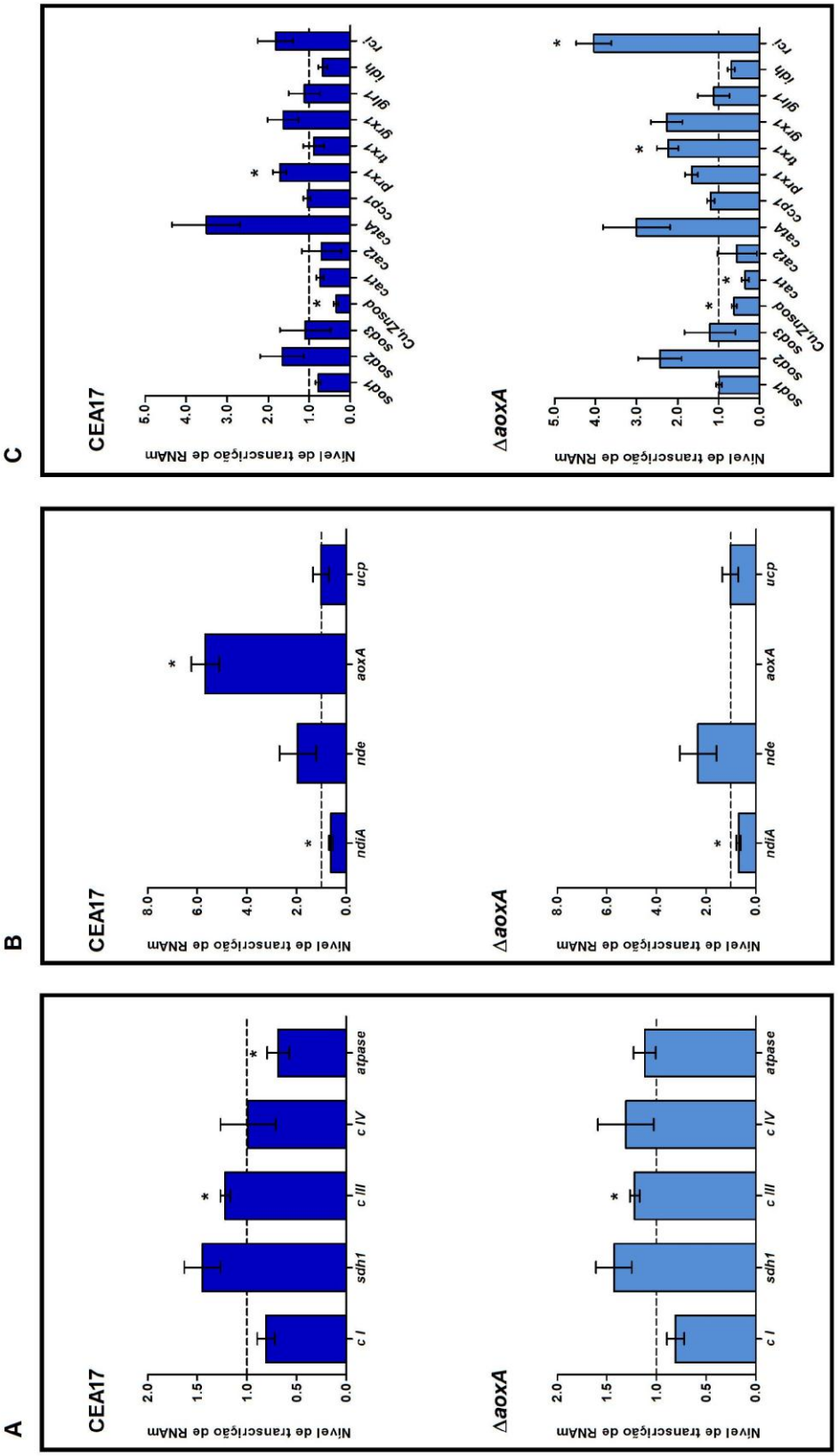


Figura 38 - Níveis de transcrição de hifas de *A. fumigatus*, cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostas à GO. (A) Genes envolvidos com a CTE; (B) Genes envolvidos com componentes alternativos da CTE; (C) Genes envolvidos com componentes antioxidantes. Valores foram normalizados a partir de GAPDH. A linha tracejada é indicativa do nível do controle admitido como calibrador. (*$P < 0,05$).

4.4 Avaliação da influência de AOX na velocidade de consumo de oxigênio em hifas de *A. fumigatus* CEA17 após exposição à menadiona

A avaliação da influência de AOX na velocidade de consumo de oxigênio foi realizada para verificar se a diferença observada nos níveis de transcritos de AOX em germinantes e hifas de CEA17 se repete nos níveis de proteína funcional encontrados nas células. Para isso foram realizados ensaios polarográficos utilizando KCN como inibidor de C IV e SHAM, inibidor de AOX.

Em hifas controle ou expostas ao pró-oxidante (Figura 39, A e B, respectivamente) não foram observadas diferenças no perfil de consumo de oxigênio, mesmo na presença de inibidores.

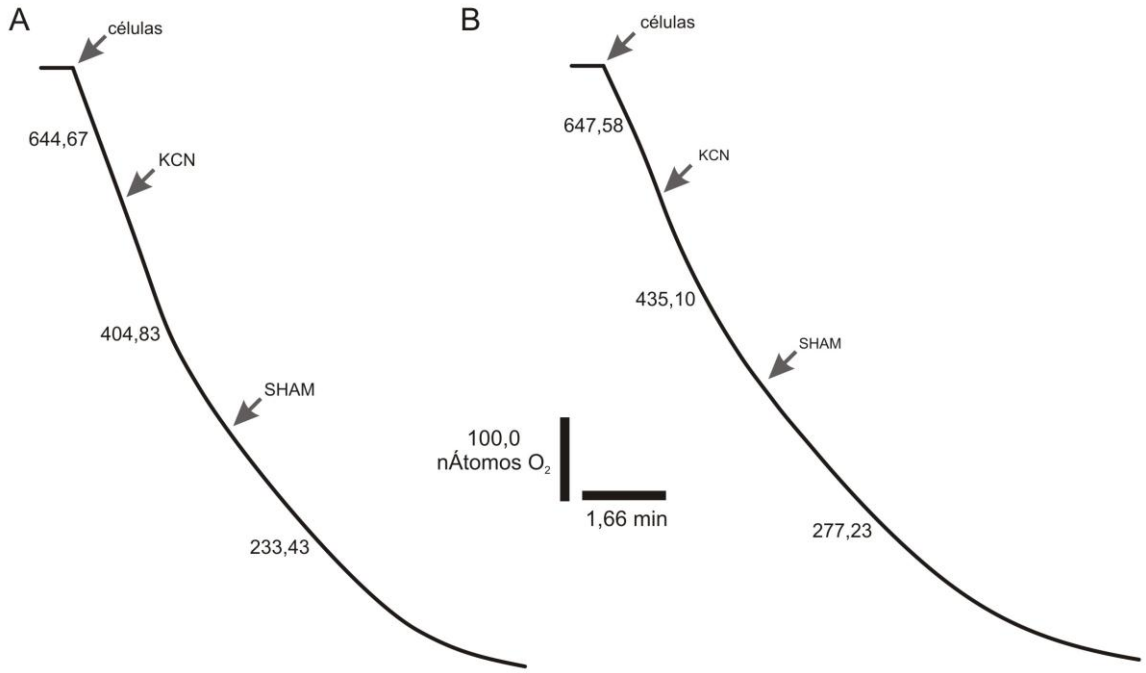


Figura 39 - Perfil do consumo de oxigênio de *A. fumigatus* CEA17 sob a ação de inibidores. As curvas são representativas de 5 experimentos independentes. KCN e SHAM foram utilizados na concentração de 2 mmol/L e meio YG + KH_2PO_4 como meio de respiração. Os números indicam a velocidade de consumo de oxigênio pelas células em n átomos O_2 min^{-1}/µg de proteína. **A** e **B:** hifas controle e expostos à menadiona. O volume de células utilizados na câmara de respiração foi de 200µL.

4.5 Avaliação da atividade de catalase (Cat) em germinantes e hifas de *A. fumigatus* CEA17 e Δ*aoxA* após a exposição à menadiona

Em ambas as fases de desenvolvimento celular houve variação da atividade específica de Cat ao se comparar as células expostas à menadiona com seus respectivos controles (Tabelas 32 e 33; Figura 40).

Germinantes apresentaram atividade específica menor que hifas em todas as situações estudadas. Ao se comparar células controle e tratadas de CEA17 e Δ*aoxA*, a atividade aumentou em ambas as cepas, indicando a interferência do pró-oxidante nessas respostas (Tabela 32).

Tabela 32 – Atividade específica de Cat em germinantes, por tratamento.

Tratamento	Germinantes[1]
Controle	1,55 [B]
Menadiona	3,33 [A]
EP	0,08

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Hifas atingiram altos níveis de atividade de Cat, sendo que controle de CEA17 atingiu maior atividade (36,15 U/mg de proteína total) do que controle de Δ*aoxA* (12,51 U/mg de proteína total). Ao se submeter hifas à menadiona, houve maior aumento de atividade em Δ*aoxA* (74,55 U/mg de proteína total) do que em CEA17 (52,73 U/mg de proteína total). A diferença entre controle e células tratadas em CEA17 foi menor que a observada em Δ*aoxA* nas mesmas condições (Tabela 33).

Tabela 33 – Atividade específica de Cat em hifas, por tratamento e por cepa.

	Cepas	
Tratamento	CEA17[1;2]	Δ*aoxA*[1;2]
Controle	36,15 [A; a]	12,51 [B; b]
Menadiona	52,73 [A; b]	74,55 [A; a]
EP	5,14	5,14

[1]Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). [2]Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

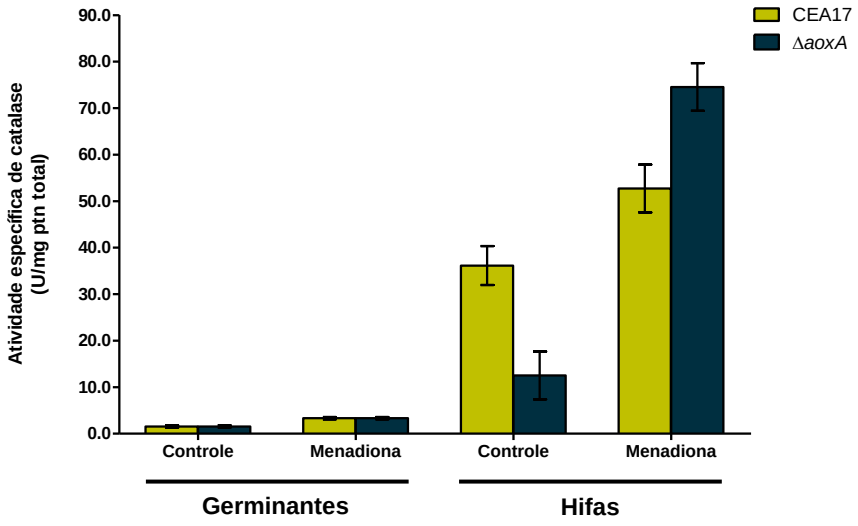


Figura 40 – Atividade específica de Cat em germinantes e hifas de *A. fumigatus* cepas CEA17 e Δ*aoxA*, expostos à menadiona.

5. Discussão

As análises realizadas foram baseadas em duas diferentes fases de desenvolvimento do *A. fumigatus*. A partir de inóculos de conídios em meio de cultura líquido, foram obtidos germinantes (após 8 horas de crescimento) e hifas (com 16 horas de crescimento), que diferem entre si morfológica e molecularmente.

A germinação de fungos filamentosos tem início somente em ambiente que forneça condições de temperatura, pH e nutrientes adequados à sobrevivência. Água, dióxido de carbono e oxigênio são exemplos de compostos utilizados por quase todos os fungos, mas existem necessidades específicas de cada espécie quanto a sais, fontes de carbono e aminoácidos.

Ela pode ser dividida em duas fases com diferentes eventos. Na fase inicial tem-se o início da respiração, a síntese de RNA e proteínas e a replicação de DNA, este último tardiamente, com entumescimento conidial e crescimento da parede celular; na fase proliferativa são frequentes as divisões nucleares e o crescimento apical com formação de hifas (D'ENFERT, 1997). Apesar de algumas contradições sobre a síntese de RNA como fator molecular essencial ao início da germinação (HOLLOMON, 1970; OSHEROV; MAY, 2000), somente a tradução foi comprovada (OSHEROV; MAY, 2000). Em *Neurospora crassa* (MIRKES, 1974) e *A. nidulans* também foram observados ribossomos livres e RNAm pré-existentes em seus conídios, que dariam início à germinação na presença de fonte de carbono (OSHEROV; MAY, 2000).

De acordo com Lamarre et al. (2008), a análise de transcritos em *A. fumigatus* durante a germinação inicial também revelou o aumento de genes envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e de redutases, como arsenato e tiorredoxina redutases, sugerindo o envolvimento da respiração celular e da defesa contra intermediários reativos logo após o início da atividade germinativa.

Em hifas são descritas as proteínas e os papéis dos genes responsáveis pela divisão nuclear, crescimento polarizado, formação de septos e regulação de osmolaridade (SEILER; JUSTA-SCHUCH, 2010; YANG et al, 2011). O gene *sho1* é importante durante o desenvolvimento de hifas em *A. fumigatus*, uma vez que está envolvido na adaptação ao estresse oxidativo e no crescimento hifal (MA et al, 2008) e atua como sensor molecular na via HOG MAPK, o qual é o sistema de sinalização de glicerol de alta osmolaridade (YANG et al, 2011).

Considerando as diferenças moleculares entre germinantes e hifas, foram analisados os níveis de transcritos de enzimas relacionadas à CTE, sendo incluídas as enzimas alternativas mitocondriais e ao sistema antioxidante de *A. fumigatus* presentes no fungo.

5.1 Enzimas da cadeia de transporte de elétrons

Menadiona, composto da classe das quinonas, é inicialmente oxidada por enzimas (e.g. NADH ubiquinona oxidorredutase – complexo I – e NADPH-citocromo P-450 redutase), gerando radicais semiquinona. Estes promovem a formação de ânion superóxido na presença de oxigênio e podem reagir com proteínas tiólicas e glutationa (CASTRO et al, 2008).

Ao se analisar os possíveis motivos que promoveram as variações de transcrição em cada caso estudado, observou-se que menadiona está ligada aos aumentos dos níveis de transcritos dos complexos I, II e IV em hifas, e com a diminuição dos níveis desses mesmos complexos em germinantes em relação aos respectivos controles (Tabelas 3, 4 e 8, respectivamente). Complexo III e ATP sintetase não apresentaram variações na presença de menadiona em nenhuma das

fases de desenvolvimento estudadas, com exceção em germinantes de Δ*aoxA*, onde os níveis de complexo III foram inferiores aos observados no controle.

Hifas das cepas CEA17 e Δ*aoxA* apresentaram níveis de transcritos de complexo II superiores aos obtidos em complexo I nas mesmas condições (Tabelas 4 e 3, respectivamente). Essa diferença pode ser decorrente da diminuição da oferta de NADH ao complexo I, uma vez que os sistemas glutationa/glutarredoxina e tiorredoxina estariam mais ativos para controlar o equilíbrio redox e estes funcionam com NADPH como doador de elétrons. Assim, parte das moléculas de NADH seria convertida a NADPH pela nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (NNT) (DRACHEV et al., 1980; HATEFI; YAMAGUCHI, 1996), aumentando as concentrações intracelulares desta coenzima e favorecendo a atividade dos sistemas redox acima descritos.. A isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (Afu1g12800, EC:1.1.1.41), está mais envolvida com o TCA. Esta enzima se mostrou com níveis de transcritos aumentados apenas em CEA17, gerando NADH para possível conversão em NADPH.

Com a diminuição da disponibilidade de NADH e diminuição da expressão de componentes do complexo I, o complexo II manteria o fluxo de elétrons na cadeia de transporte, utilizando succinato como doador de equivalentes redutores. O fato de complexo I também ser um dos principais pontos de geração de EROs, com dois sítios de formação de ânion superóxido (LAMBERT; BRAND, 2004), sua menor expressão poderia gerar uma menor quantidade de EROs formadas, colaborando para a redução dessas espécies produzidas pela menadiona.

O complexo III não apresentou variações significativas em suas expressões, com exceção do tratamento de hifas com paraquat, que promoveu diminuição dos níveis de expressão. O complexo III é um reconhecido ponto gerador de EROs

(DRÖSE; BRANDT, 2008). A formação do par redutor “radical semiquinona/ubiquinona” ($UQ^{\bullet-}$/UQ) nos sítios Qp e Qn do complexo, promove a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) quando oxigênio entra em contato com ambos os sítios (TURRENS; ALEXANDRE; LEHNINGER, 1985; ST-PIERRE et al, 2002). O agente pró-oxidante teria provocado diminuição da atividade desta enzima como forma de defesa celular. Esta hipótese estaria de acordo com o sugerido para leveduras (FUKUSHIMA et al, 2002), onde a inibição do complexo III gerou resistência do microrganismo ao pró-oxidante. Adicionalmente, estudos anteriores sugeriram o desacoplamento da fosforilação oxidativa através da peroxidação lipídica e ação inibitória da cadeia redox e da ATP sintetase na presença de paraquat (PALMEIRA, MORENO; MADEIRA, 1995). Isto corrobora os resultados obtidos com a expressão diferencial de ATP sintetase em hifas de ambas as cepas avaliadas.

5.2 Componentes alternativos mitocondriais

Entre todos os pró-oxidantes, a menadiona promoveu as maiores variações dos níveis de transcritos nas enzimas UCP-*like*, AOX e Nde. Na NdiA este pró-oxidante promoveu diminuição desses níveis nas duas fases de desenvolvimento (germinante e hifa).

Os altos níveis de transcritos apresentados por UCP-*like* em hifas de CEA17 e Δ*aoxA* tratadas com menadiona sugerem sua função desacopladora ligada à proteção celular contra EROs, uma vez que diminui o estado reduzido mitocondrial (SLUSE et al, 2006). Esta enzima, juntamente com a AOX, também com altos níveis de transcritos em hifas expostas à menadiona, pode explicar a falta de variação nos níveis de ATP sintetase nesta condição, uma vez que as vias alternativas

pressupõem a diminuição da formação de ATP. Além disso, a presença de enzimas alternativas constitui vantagem para a prevenção da liberação de EROs pela mitocôndria (KOWALTOWSKI et al*,* 2009), sendo forma de controle redox para os organismos que as possuem, incluindo *A. fumigatus*.

Ao se comparar os resultados obtidos com *c I* e *ndiA* em hifas expostas à menadiona, o aumento da expressão de complexo I está diretamente relacionado à diminuição dos níveis de expressão da enzima alternativa.

A NdiA é responsável pela regulação do balanço redox em relação ao NADH sintetizado no ciclo do ácido cítrico (FANG; BEATTIE, 2003) e é sugerida sua complementaridade funcional ao complexo I, apesar de sua insensibilidade à rotenona (DUARTE et al, 2003). Através da oxidação de NADH encontrado na matriz mitocondrial, NdiA reduz ubiquinona, desviando os elétrons do complexo I e não promovendo bombeamento de prótons para o espaço intermembrana. Com isso, a síntese de ATP é desfavorecida e ocorre a prevenção de redução excessiva de NAD^+/NADH na matriz (MAAS et al, 2010). Como a NdiA apresentou baixos níveis de transcrição e o complexo I níveis mais altos em hifas, corrobora a hipótese de que ambas estejam funcionalmente relacionadas.

Caso os aumentos dos níveis de transcritos do *sdh1* e da *nde*, observados em hifas tratadas com menadiona, estejam relacionados ao aumento de atividade de ambas as enzimas relacionadas, é possível sugerir atividades complementares com manutenção da CTE, mas com diminuição do bombeamento de prótons. Como o fornecimento de NADH proveniente da matriz mitocondrial para complexo I está diminuído, Nde capta NADH proveniente do citoplasma e o disponibiliza para a CTE (YAGI et al, 2001), permitindo o funcionamento da CTE juntamente com a ação de complexo II, mesmo que lentamente.

Além disso, a Nde parece ter uma importante função antioxidante. Em plantas, foi relatada a relação entre baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e a ativação da expressão dos genes da Nde e da AOX, concomitantemente (EPRINTSEV et al, 2011). Os resultados obtidos com *A. fumigatus* mostraram aumentos de transcritos de Nde da ordem de 19 vezes e de AOX, de 56 vezes em hifas expostas à menadiona. A formação de EROs pelos pró-oxidantes e o índice de expressão atingido por essas enzimas sugerem a participação de ambas na detoxificação dessas espécies. Estes resultados corroboram a conclusão de que fungos filamentosos, em situações de estresse oxidativo, convergem o fluxo de elétrons da cadeia de transporte clássica para a via alternativa (LI et al, 2011).

5.3 Enzimas antioxidantes

O tratamento com paraquat promoveu aumentos significativos de transcritos das enzimas antioxidantes clássicas (Sods 1 e 2, Cat1, 2 e A, Ccp1, Prx1, Trx1, Glr1 e peptídeo RCI). A ação deste pró-oxidante se baseia em sua redução, formando radical que converte oxigênio em ânion superóxido em um ciclo redox (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Dentre as teorias aceitas para a formação do radical de paraquat está sua redução pelo complexo I mitocondrial e provável desacoplamento da CTE (FUKUSHIMA et al, 2002).

Poucos resultados obtidos com o sistema glicose oxidase, por sua vez, apresentaram variações significativas. Em germinantes, somente *idh* apresentou diminuição nos níveis de seus transcritos, sugerindo influência das EROs na velocidade do TCA. *CuZnsod* também teve seus níveis de transcritos diminuídos com a exposição à menadiona em germinantes e hifas e *prx1* e *trx1* apresentaram pequeno aumento em CEA17 e Δ*aoxA*, respectivamente. Isto sugere que o H_2O_2

formado não foi capaz de sensibilizar nenhuma das fases de desenvolvimento celular, como os outros pró-oxidantes, para respostas significativas.

A enzima glicose oxidase converte β-D-glicose em ácido glucônico, com formação intermediária de D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio (KLEPPET, 1966). Com flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como coenzima para a catálise (WILSON; TURNER, 1992), sua atividade só é cessada após diminuição do pH para níveis abaixo de 4 e acima de 7 (TSUGE; NATSUAKI; OHASHI, 1975) com a formação do ácido glucônico e pelo acúmulo de H_2O_2 (BAO et al., 2003). Ela é naturalmente sintetizada por insetos e fungos, como exemplo *Appis mellifera* e *A. niger*, para funções antifúngicas, bactericidas, de diminuição do pH intracelular, entre outras (WONG; WONG; CHEN, 2008). O H_2O_2 formado é importante nessas funções, uma vez que concentrações da ordem de micro molar de peróxido formado e mantido pela ação catalítica constante da enzima, são suficientes para a diminuição do crescimento celular. Esta ação, bem como sua atividade constante, foram os fatores que levaram à escolha do sistema glicose oxidase como promotora de EROs. Outro fator foi a presença de três catalases em *A. fumigatus* (CADRE), que impediria a ação de H_2O_2 por 8 horas sem que houvesse uma fonte geradora no meio de cultura.

Menadiona foi novamente responsável pela maioria das variações de níveis de transcritos em enzimas antioxidantes clássicas, como superóxido dismutase (Sod) 1 e 2, catalases (Cat) 1, 2 e A, citocromo C peroxidase (Ccp1), peroxirredoxina (Prx1), tiorredoxina (Trx1), glutarredoxina (Grx1), glutationa redutase (Glr1) e peptídeo RCI. Entretanto, o número de enzimas com esses níveis alterados foi diferente ao se comparar germinantes de CEA17 com as outras condições estudadas. Nesta cepa, foram observadas variações significativas apenas em Sods

1, 2 e 3, em Cat1, Ccp1 e Trx1, além de RCI, utilizada como controle para a resposta à indução ao estresse, enquanto que praticamente todas as enzimas apresentaram níveis de transcritos alterados nas outras condições. A composição da parede celular e a presença de *aoxA* podem sugerir a diferença entre germinantes e hifas e entre cepas, respectivamente. Ambas as camadas, interna e externa, da parede celular de *A. fumigatus* possuem variação em sua composição de acordo com a o estágio de desenvolvimento do fungo (LATGÉ, 2010). Os conídios, como células quiescentes e adaptadas para a resistência física e química, apresentam além de camada interna de complexo glucana-quitina, uma densa camada externa de melanina (BERNARD; LATGÉ, 2001), composto envolvido na organização da parede celular e na defesa celular contra EROs produzidas por fagócitos (PIHET et al, 2009). Germinantes, por sua vez, expõem polissacarídeos e proteínas glicosiladas de sua parede celular, enquanto que, hifas expõem apenas os polissacarídeos em qualquer região ao longo de sua estrutura (LATGÉ, 2010). Tomando por base essa diferença morfológica, bem como a ausência de matriz extracelular em hifas cultivadas em meio líquido (LATGÉ, 2010), é sugerido que a função da parede celular de hifas esteja relacionada ao controle de permeabilidade, permitindo a liberação de hidrolases que auxiliam na invasão do parênquima pulmonar quando do desenvolvimento da aspergilose (BERNARD; LATGÉ, 2001). Assim, o aumento da transcrição de genes relacionados à defesa antioxidante em hifas auxiliaria na defesa contra EROs, compensando a ausência da barreira física. A ausência de *aoxA* também seria compensada por um número maior de enzimas antioxidantes, uma vez que já foi descrito a ação da AOX contra o estresse oxidativo promovido por menadiona (MAGNANI et al, 2008; MARTINS et al, 2011) e por células semelhantes a macrófagos (GRAHL et al, 2012).

As Sods 1 (Cu,Zn, citoplasmática), 2 (Mn, mitocondrial) e 3 (Mn, citoplasmática) apresentaram aumentos significativos de transcritos na presença de menadiona, observados tanto em germinantes quanto em hifas. Menadiona, como uma quinona, foi descrita como indutora da atividade de MnSods em *Escherichia coli*, podendo reagir com H_2O_2 do ambiente celular e formar radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) na presença de íons metálicos (Fe^{3+}, por exemplo) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Isto explicaria o aumento na expressão das Sods 2 e 3, porém, não o observado em *sod1*. De acordo com Leal Jr. (2012), Sod3 é a SOD mais expressa em hifas sob condições de estresse oxidativo, sendo classificada como funcionalmente dominante em hifas de *A. fumigatus*. Os resultados obtidos com hifas expostas à menadiona, principalmente em CEA17, apresentaram maiores níveis de *sod3* em relação aos germinantes (LEAL Jr. et al, 2012).

Durante o crescimento de *A. fumigatus* da cepa akuB^{ku80}, foram observados altos níveis de transcrição de *sod1* e *sod2* em conídios e de *sod3* em micélio (LAMBOU et al, 2010). Estes resultados corroboram as variações nos transcritos de *sods 1* e *2* em germinantes e de *sod3* em hifas, além da ausência de alteração nos níveis de transcritos de *sod1* em hifas de ambas as cepas. *Cu,Znsod* também apresentou padrão de transcrição, não variando seus níveis em ambas as fases de desenvolvimento de CEA17. Aparentemente nenhuma das MnSods está associada com a virulência do *A. fumigatus*, e nem a Cu,ZnSod, que havia sido sugerida como possível protetora do fungo contra superóxidos sintetizados extracelularmente (FANG, 1997; HAMILTON; HOLDOM, 1999). É sugerido que a atividade das Sods seja exclusivamente intracelular e que Sods 1 e 2 sejam responsáveis pela maior parte da atividade desta família de enzimas (LAMBOU et al, 2010).

Os níveis de transcritos de catalase micelial (*cat1*) em germinantes expostos aos pró-oxidantes foram superiores aos apresentados por hifas submetidas aos mesmos tratamentos. Estes últimos não atingiram os níveis apresentados pelo controle, com exceção da cepa Δ*aoxA* que, tratada com paraquat, teve seus transcritos aumentados.

A catalase-peroxidase (Cat2), uma heme-catalase (SCHERER et al, 2002) pode agir ou como H_2O_2 oxidoredutase ou como H_2O_2:H_2O_2 oxidoredutase (TAKASUKA et al, 1999). Seus níveis de transcritos, superiores em hifas, sugerem maior susceptibilidade dessa fase de desenvolvimento aos EROs em relação às mesmas condições em germinantes. Para catalase esporo-específica (*catA*), os níveis de transcritos na cepa Δ*aoxA* foram maiores do que os apresentados por *cat2*, diferentemente do encontrado em CEA17. Como CatA não é considerada fator de virulência (PARIS et al, 2003), isto pode sugerir uma nova participação de CatA contra EROs extracelulares na ausência de *aoxA*, exigindo mais estudos em relação à atividade de CatA e de AOX neste contexto.

A análise da atividade específica de Cat em germinantes e hifas de ambas as cepas tratadas com menadiona levou à comparação entre os perfis de seus níveis e os níveis de transcritos para as catalases. A influência exclusiva do tratamento na atividade de Cat em germinantes pode indicar presença predominante de Cat1 nesta fase de desenvolvimento de *A. fumigatus*. Esta observação pode ser reforçada com a diminuição dos níveis de transcritos da enzima em relação ao controle em hifas de ambas as cepas (Tabelas 3 e 4) e com o fato desta enzima, juntamente com a Cat2, ser considerada fator de virulência (PARIS et al, 2003), própria da fase de desenvolvimento em questão. Em hifas, a atividade específica tanto em CEA17 quanto em Δ*aoxA* foram superiores ao obtido nos controles de

ambas as cepas, seguindo o padrão observado na análise de transcritos de CatA e Cat2.

Entre as enzimas tiólicas estudadas, a Prx1 mitocondrial foi a que apresentou os menores níveis de transcritos, tanto em germinantes quanto em hifas. E nessas duas fases de desenvolvimento todos os pró-oxidantes promoveram aumentos desses níveis, sendo as respostas à menadiona e paraquat superiores às obtidas com glicose oxidase. Além disso, *prx1* e *trx1* apresentaram em Δ*aoxA* níveis superiores aos encontrados em CEA17, sugerindo que a deleção de *aoxA* interfere na transcrição dessas enzimas, na tentativa de compensar a ausência de AOX no processo antioxidante. Prx1 é um antioxidante específico para tióis e uma alquilhidroperóxido redutase, reduzindo H_2O_2, peroxinitrito e outros hidroperóxidos orgânicos; porém, em mamíferos, a família das peroxirredoxinas compreendem enzimas com funções de modulação de níveis de H_2O_2 induzidos por citocina, influenciando na sinalização celular e controle da proliferação celular, diferenciação e apoptose (WOOD et al, 2003). Em bactérias foi descrito que AhpC, enzima da família das peroxirredoxinas, reduz H_2O_2 endógeno (COSTA SEAVER; IMLAY, 2001). Recentemente, Prx1, uma peroxirredoxina mitocondrial de *S. cerevisiae*, também foi descrita como molécula redox de sinalização, oxidando Trx mitocondrial (Trx3) e promovendo apoptose quando Prx1 não é capaz de detoxificar EROs mitocondriais (GREETHAM et al, 2012). Prx de *A. fumigatus* é uma 1-Cys Prx (CADRE), com uma cisteína de função peroxidásica (Cys91) sem a capacidade de formar pontes dissulfeto, mas mantendo a função de reduzir hidroperóxidos. A 1-Cys Prx de levedura quando oxidada é glutationilada pela GSH, formando ponte dissulfeto mista, que é reduzida pela tiorredoxina redutase 2 (Trr2) associada à uma GSH, e não pelo sistema Trx como ocorre com Prxs que formam as pontes

dissulfeto (GREETHAM; GRANT, 2009). Uma investigação mais específica poderia analisar a relação dos baixos níveis de transcritos da Prx1 de *A. fumigatus* em relação à Trx e Grx com a função de detoxificação de hidroperóxidos endógenos, associando a possibilidade de regulação da sinalização celular. Trx1 e Grx1 estariam envolvidas com a defesa mais efetiva do fungo às EROs geradas pela menadiona. Outro aspecto a ser analisado posteriormente é a possibilidade de Glr1 estar envolvida no ciclo redox de Prx1 de *A. fumigatus*, participando da redução do complexo Trr2/GSSG. Isto é justificado pelos perfis dos níveis de transcritos de *prx1* e *glr1* serem semelhantes, apresentando-se maiores em hifas do que em germinantes.

O sistema GSH/glutationa peroxidase (GSHp) atua de modo coordenado contra EROs (HAYES; MCLELLAN, 1999). A GSHp detoxifica o H_2O_2 formado e retorna ao seu estado reduzido pela doação de elétrons da GSH. Esta é novamente reduzida pela ação da Glr1 através da transferência de elétrons de NADPH (HOLMGREN, 1989). Assim, o aumento dos níveis de transcritos de Glr1 pode estar ligado ao aumento da transcrição e da capacidade redutora de GSH, sugerindo hifas mais sensíveis às EROs que germinantes, uma vez que GSH se constitui em importante mantenedor da homeostase redox intracelular, atuando sobre peróxidos, ânion superóxido e produtos de peroxidação lipídica (GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA, 2007; TURTON; DAWES; GRANT, 1997).

A Trx1, outra tiol-peroxidase com estrutura, sítio ativos e funções semelhantes às de Grx1, também possui atividade coordenada com outras enzimas. Tiorredoxina redutase, na presença de Trx, reduz tiorredoxina peroxidase, a qual degrada peróxidos (CHAE; CHUNG; RHEE, 1994). A ação de Trx na redução de pontes dissulfeto em proteínas geralmente danificadas por espécies reativas está

bem caracterizada. Porém, em *S. cerervisiae*, a deleção de genes responsáveis pela expressão de Trx (Trx1 ou Trx2) aumentou as concentrações de GSH em sua forma reduzida e oxidada, aumentando também a sensibilidade da cepa ao H_2O_2 (GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA, 2007). Com isso, observa-se a ligação entre os sistemas Trx e GSH/Grx, o que pode ser observado nos resultados obtidos. Quanto maior o nível de transcrito de *trx1*, menores os níveis de *grx1* e *glr1* em hifas de CEA17 e germinantes de ambas as fases de desenvolvimento, sendo que germinantes de Δ*aoxA* apresentaram os maiores níveis observados para esta enzima. Este pode ser um indicativo de que, em hifas, o sistema GSH/Grx esteja mais ativo contra EROs e que haja uma atividade coordenada entre AOX e Trx1, uma vez que em ambas as fases de desenvolvimento, a ausência de *aoxA* esteve relacionada ao aumento de transcritos de Trx1. Esta agiria como redutora de proteínas que apresentam pontes dissulfeto geradas pela ação de EROs (HOLMGREN et al, 2005) e não como substituinte da atividade de AOX (detoxificação de EROs). Esta hipótese pode ser corroborada pela constatação de que Trx citoplasmáticas são essenciais para a sobrevivência de hifas na presença de neutrófilos (LEAL JR et al, 2012). Assim, a falta de melhor controle dos níveis de EROs intracelulares levaria ao aumento da atividade reparadora de proteínas. Em plantas, foi descrita a ação de Trx mitocondrial na redução de pontes dissulfeto de AOX e a regulação pós-transcricional e pós-traducional tanto de Trx quanto de AOX (MARTÍ et al, 2011; MILLAR et al, 1993). Em *A. fumigatus*, Af*yap*1, fator de transcrição sensível às EROs, regula os níveis de Prx e da via de Trx em situações de estresse oxidativo (LEAL JR et al, 2012). Assim, a regulação de Trx1 e AOX podem se constituir em fator de estudos posteriores.

Em nosso laboratório foi observado o aumento dos níveis de transcritos e de atividade de AOX em germinantes de *A. fumigatus* exposto à menadiona (MAGNANI et al, 2007). Em hifas, apesar do aumento significativo dos níveis de transcritos de CEA17 exposta à menadiona, não houve variação na taxa de consumo de oxigênio entre células tratadas e não tratadas com o pró-oxidante na presença de KCN, necessitando de estudos adicionais para a confirmação deste resultado. Ensaios de atividade *in vivo*, de níveis de proteína e de determinação de níveis de transcritos de AOX feitos com plantas descrevem discrepâncias entre si, sugerindo atividades de regulação da via alternativa por parte da AOX, seu papel na defesa celular contra EROs (RASMUSSON; FERNIE; DONGEN, 2009) ou regulações pós-traducionais da enzima (MARTÍ et al, 2011).

6. Conclusões

Os resultados obtidos com as análises de transcritos de *A. fumigatus* em suas fases de desenvolvimento e cepas demostraram a diferença na resposta aos efeitos oxidativos promovidos pela menadiona e paraquat. O sistema glicose/glicose oxidase utilizado para a geração de peróxido de hidrogênio não foi eficiente na sensibilização das cepas para se obter uma análise significativa de seus efeitos na transcrição das enzimas avaliadas.

Em geral, os níveis de transcritos das enzimas envolvidas na CTE, sendo elas clássicas ou alternativas, e na defesa antioxidante foram influenciados pelos pró-oxidantes utilizados, pela fase de desenvolvimento em questão (germinante ou hifa), pela presença de AOX ou pela interação entre elas.

A ausência de AOX influenciou todos os níveis de transcritos de enzimas antioxidantes em hifas tratadas com menadiona, sugerindo maior sensibilidade desta fase celular em relação aos germinantes da mesma cepa. Entretanto, germinantes de CEA17 tiveram todos os transcritos de genes envolvidos com as enzimas alternativas da CTE alterados pelo efeito do pró-oxidante, sugerindo maior controle do estado redox celular e menor necessidade de enzimas antioxidantes. Dentre essas enzimas, destaca-se a Cat2, que parece apresentar importante papel como fator de virulência de *A. fumigatus* em hifas.

6. Referências Bibliográficas

ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 155-182, 2010.

AGUIRRE, J., et al. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 111-118, 2005.

ALANIO, A.; CORDONNIER, C.; BRETAGNE, S. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* - current epidemiology and future perspectives. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, p. 168-178, 2011.

ALBURY, M.; ELLIOTT, C.; MOORE, A.L. Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 316-327, 2009.

AMOR, Y.; CHEVION, M; LEVINE, A. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H_2O_2-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. **FEBS Letters**, v. 477, n. 3, p. 175-180, 2000.

ARNAUD, M.B. et al. Aspergillus Genome Database (AspGD). Banco de dados. Disponível em: <http://www.aspergillusgenome.org/>. Acesso em 25 jun. 2012.

BADIEE, P.; ALBORZI, A. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. **Experimental and Clinical Transplantation,** v. 9, n. 6, p. 355-362, 2011.

BAI, Z.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 267-302, 2003.

BALLOY, V; CHIGNARD, M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 919-927, 2009.

BANDEIRAS, T.M. et al. The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1557, n. 1-3, p. 13-19, 2003.

BAO, J. et al. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p. 91-102, 2001.

BELOZERSKAYA, T.A.; GESSLER, N.N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 506-515, 2007.

BEHNSEN, J. et al. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 820-827, 2008.

BEHNSEN, J. et al. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 8, p. 3585-3594, 2010.

BERNARD, M.; LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 9±17, 2001, Supplement 1.

BIAGINI, G.A. et al. Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1841-1851, 2006.

BJÖRKLÖF, K.; ZICKERMANN, V.; FINEL, M. Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. **FEBS Letters**, v. 467, n. 1, p. 105-110, 2000.

BODEY, G.P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 413-437, 1989.

BONNER, W.D.; VOSS, D.O. Some characteristics of mitochondria extracted from higher plants. **Nature**, v. 191, p. 682-684, 1961.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorilation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 70, p. 2837-2839, 1973.

BOYER, P.D. et al. Oxidative phosphorilation and photophosphorylation. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 46, p. 955-1026, 1977.

BRAKHAGE, A. A. Systemic fungal infections caused by Aspergillus species: epidemiology, infection process and virulence determinants. **Current Drug Targets,** v. 6, n. 8, p. 875-86, 2005.

BRAKHAGE, A.A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 433-455, 2002.

CADRE the Central Aspergillus Data REpository. *Software BLASTView*. Disponível em < http://www.cadre-genomes.org.uk/Aspergillus_fumigatus/blastview >. Acesso em: nov. 2009.

CADRE the Central Aspergillus Data REpository 2012. Banco de dados. Disponível em < http://www.cadre-genomes.org.uk>. Acesso em: 25 jun. 2012.

CALEGARIO, F.F. et al. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 35, n. 3, p. 211-220, 2003.

CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **The LANCET Infectious Diseases**, v.8, n. 2, p. 114-124, 2008.

CASTRO, F.A.V. et al. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, e3999, 2008.

CAVALHEIRO, R.A. et al. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1455-1461, 2004.

CHAE, H. Z.; RHEE, S. G. A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. **Biofactors**, v. 4, p. 177-180, 1994.

CHAE, H.Z.; CHUNG, S.J.; RHEE, S.G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 27670-27678, 1994.

CHAE, M.S.; NARGANG, F.E. Investigation of regulatory factors required for alternative oxidase production in *Neurospora crassa*. Physiologia Plantarum, v. 137, n.4, p. 407-418, 2009.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHANCE, B.; WILLIAMS, .G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, v. 17. p. 65-134, 1956.

CHATURVEDI, A.K. et al. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 9, p. 1063-1068, 2005.

COSTA SEAVER, L.; IMLAY, J.A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 7173-7181, 2001.

CZARNA M; JARMUSZKIEWICZ W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria**. FEBS Letters,** v. 579, p. 3136-3140, 2005.

de VRIES, S.; MARRES, C.A. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 895, n. 3, p. 205-239, 1987.

de VRIES, S.; GRIVELL, L.A. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 176, n. 2, p. 377-384, 1988.

DENNING, D.W. Invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 781-805, 1998.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, p. 1142–1151, 2003.

DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 195-204, 2010.

DINAMARCO, T.M. et al. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukariotic Cell**, v. 11, n. 4, p. 518-531, 2012.

DRACHEV, L.A. et al. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. **European Journal of Biochemistry**, v. 113, p. 213-217, 1980.

DRÖSE, S.; BRANDT, U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 21649-21654, 2008.

DUARTE, M. et al. The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 371, p. 1005–1011, 2003.

d'ENFERT, C. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa***. Fungal Genetics and Biology**, v. 21, 163-172, 1997.

EPRINTSEV, A.T. et al. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of coexpression of alternative oxidase and rotenone-insensitive NADH dehydrogenase in tomato leaves and calluses. (Abstract) **Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk - Seriya Biologicheskaya**, v. 1, p. 45-51, 2011.

ESCHEMANN, A. et al. HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: evidence for a ping-pong mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3138-3142, 2005.

FANG, J.; BEATTIE, D.S. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 4, p. 478–488, 2003.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FRIDELL, Y.W.C. et al. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 3, p. 219-228, 2004.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FUKUSHIMA, T. et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 7, p. 89–94, 2002.

GENE RUNNER. *Software* gratuito. Disponível em: <http://www.generunner.net/>. Acesso em: nov. 2009.

GESSLER, N.N.; AVER'YANOV, A.A.; BELOZERSKAYA, T.A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1091-1109, 2007.

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

GRAHL et al. Aspergillus fumigatus mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 383-399, 2012.

GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 533-541, 2001.

GRAPHPAD PRISM for Windows. Versão 5.01. GraphPad Software, Inc, 2007.

GREETHAM, D.; GRANT, C.M. Antioxidant activity of the yeast mitochondrial 1-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. **Molecular and Cellular Biology**. v. 29, p. 3229-3240, 2009.

GREETHAM, D. et al. Oxidation of the yeast mitochondrial thioredoxin promotes cell death. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2012. doi: 10.1089/ars.2012.4597.

GROSS, N.T. et al. Production of nitric oxide by rat alveolar macrophages stimulated by *Cryptococcus neoformans* or *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 37, n. 3, p. 151–157, 1999.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw? **BioCycle**, v. 36, n. 4, p. 32-35, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, Clarendon Press, p. 86-187, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-619, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Reactive species can pose special problems needing special solutions: some exemples. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, Oxford University Press, p. 341-394, 2007.

HAMILTON, A.J.; HOLDOM, M.D. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. **Medical Mycology**, v. 37, p. 375-389, 1999.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorilation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HATEFI, Y.; YAMAGUCHI, M. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a model for utilization of substrate binding energy for proton translocation. **FASEB Journal**, v. 10, n. 4, p. 444-52, 1996.

HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzyme represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, p. 273–300, 1999.

HERBRECHT, R. et al. Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 6, p. 408-415, 2002.

HOFMANN, B.; HANS-JÜRGEN HECHT, H-J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 347-364, 2002.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13963–13966, 1989.

HOLMGREN, A. et al. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1375-1377, 2005.

HOLLOMON, D.W. RNA synthesis during fungal spore germination. **Journal of General Microbiology**, v. 62, p. 75-87, 1970.

HORN, F. et al. Systems biology of fungal infection. **Frontiers in Microbiology,** v. 3, p. 1-20, 2012.

INVITROGEN. D-LUX™ Designer Software. Disponível em: <http://escience.invitrogen.com/lux/index.jsp?>. Acesso em: nov. 2009.

ITO, J.I.; LYONS, J.M. Vaccination of corticosteroid immunossupressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 869-871, 2002.

JARMUSZKIEWICZ, W. et al. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. **FEBS Letters**, v. 467, n. 2-3, p. 145-149, 2000.

JARMUSZKIEWICZ, W. et al. Redox state of endogenous coenzyme Q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondrial. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 5, p. 493-502, 2004.

JARMUSZKIEWICZ, W. et al. In phosphorylating *Acanthamoeba castellanii* mitochondria the sensitivity of uncoupling protein activity to GTP depends on the redox state of quinone. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 37, n. 2, p. 97-107, 2005.

JARMUSZKIEWICZ, W. et al. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 792-799, 2010.

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

KAPLAN, S.S. et al. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 69-76, 1996.

KARTSONIS, N.A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. Drug **Resistance Updates**, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.

KERSCHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1459, p. 274-283, 2000.

KIM, J.H. et al. Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function. **Journal of Applied Microbiology**, 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. **Current Genetics**, v. 34, p. 472-477, 1999.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 257-260, 2002.

KLEPPET, K. The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 5, p. 139–143, 1966.

KOSHLAND, D. E. JR.; WALSH, K.; LAPORTE, D. C. Sensitivity of metabolic fluxes to covalent control. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 27, p. 13–22, 1985.

KOHARYOVA, M; KOLAROVA, M. Oxidative stress and thioredoxin system. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, n. 2, p. 71-84, 2008.

KOWALTOWSKI, A.J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 333–343, 2009.

KRAUSE, F. et al. Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26453–26461, 2004.

KUMAR, C. et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 10, p. 2044–2056, 2011.

LAMARRE, C. et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC Genomics**, v. 9, n. 417, 2008. doi:10.1186/1471-2164-9-417

LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 39414–39420, 2004.

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004.

LAMBOU, K. et al. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 4, 910-923, 2010.

LANGFELDER, K. et al. Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of Aspergillus fumigatus involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. **Medical Microbiology and Immunology,** v. 187, n. 2, p. 79-89, 1998.

LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LATGÉ, J-P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

LATGÉ, J-P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 355-358, 2002.

LATGÉ, J-P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 7, 863-872, 2010.

LEAL JR., S.M. et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, 2012.

LEFEVER, S. et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 7, p. 2065–2069, 2009.

LEE, S.U. et al. Cytosolic $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1185–1196, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. Oxidative phosphorilation and photophosphorilation. In: **Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, Inc., p. 542-597, 2002.

LI, Q. et al. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 142, n. 1, p. 129-140, 1996.

LI, Q. et al. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 457–467, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LORIN, S. et al. Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1259-1267, 2001.

MA, Y. et al. The sho1 sensor regulates growth, morphology, and oxidant adaptation in *Aspergillus fumigatus* but is not essential for development of invasive pulmonary aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1695-1701, 2008.

MAAS, M.F.P.M. et al. Respiratory complexes III and IV are not essential for the assembly/stability of complex I in fungi. **Journal of Molecular Biology**, v. 387, p. 259–269, 2009.

MAAS, M.F.P.M. et al. Molecular Gene Therapy: Overexpression of the alternative NADH dehydrogenase NDI1 restores overall physiology in a fungal model of respiratory complex I deficiency. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, p. 31–40, 2010.

MAGNANI, T. et al. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, n. 2, p. 230-238, 2007.

MAGNANI, T. et al. Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 40, p. 631-636, 2008.

MARQUES, I. et al. Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 12, p. 2391–2405, 2007.

MARR, K.A. et al. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1240-1247, 2001.

MARTÍ, M.C. et al. Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3863-3874, 2011.

MARTINS, V.P. et al. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 81-88, 2011.

MATSUSHITA, K.; OHNISHI, T.; KABACK, H.R. NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia-coli* aerobic respiratory-chain. **Biochemistry,** v. 26, n. 24, p. 7732-7737, 1987.

MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 1535–1543, 2010.

MCDONALD, A. E.; AMIRSADEGHI, S.; VANLERBERGHE, G. C. Prokaryotic orthologues of mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase. **Plant Molecular Biology,** v. 53, p. 865–876, 2003.

MCDONALD, A.E.; VANLERBERGHE, G.C. Branched mitochondrial electron transport in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. **IUBMB Life**, v. 56, n. 6, p. 333-341, 2004.

MELO, A.M. et al. The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3947-3951, 2001.

MILLAR, A.H. et al. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Letters**, v. 329, p. 259–262, 1993.

MINAGAWA, N.; YOSHIMOTO, A. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **The Journal of Biochemistry**, v. 101, n. 5, p. 1141-1146, 1987.

MINAGAWA, N. et al. An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 48, n. 2, p. 271-280, 1997.

MIRKES, P.E. Polysomes, Ribonucleic acid, and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n.1, p. 196-202, 1974.

MIRON, J. et al. A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 513-522, 2004.

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

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

MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.

MOORE, A.L. et al. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger?. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 11, p. 478-481, 2002.

MORGAN, J. et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. **Medical Mycology**, v. 43, p. S49-S58, 2005. Supplement I.

NAGASAKI, Y. et al. Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 379-382, 2009.

NAVET, R. et al. Regulation of uncoupling protein activity in phosphorylating potato tuber mitochondria. **FEBS Letters**, v. 579, n. 20, p. 4437-4442, 2005.

NEWTON, G.L. et al. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1990-1995, 1996.

NCBI National Center for Biotechnology Information. *Software blastn suite*. Disponível em: < http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>. Acesso em: nov. 2009.

NCBI National Center for Biotechnology Information. Banco de dados. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 25 jun. 2012.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, n. 5, 1999.

NIERMAN, W.C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.

O'DONNELL, A.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. The roles of the alternative NADH dehydrogenases during oxidative stress in cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. **Fungal Biology**, n.115, p. 359-369, 2011.

OETTMEIER, W. et al. Acridones and quinolones as inhibitors of ubiquinone functions in the mitochondrial respiratory chain. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. 1, p. 213-216, 1994.

OK, M.; EINSELE, H.; LOEFFLER, J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 445–452, 2011.

OSHEROV, N.; MAY, G. Conidial germination in aspergillus nidulans requires RAS signaling and protein synthesis. **Genetics**, v. 155, p. 647-656, 2000.

OSTROSKY-ZEICHNER, l. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 719-727, 2010.

PAGLIARINI, D.J.; DIXON, J.E. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 1, 26-34, 2006.

PALMEIRA, C.M.; MORENO, A.J.; MADEIRA, V.M.C. Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1229, p. 187-192, 1995.

PAPA, S.; SKULACHEV, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v.174, p.305-319, 1997.

PARIS, S. et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3551-3562, 2003.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. V. 29, n. 900, p. 2002-2007, 2001.

PIHET, M. et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 177, 2009. doi:10.1186/1471-2180-9-177.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology,** v. 32, p. 17-32, 1994. Supplement I.

POLONI, T.R.R.S. **Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real**. 2009. 56f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

POULSEN, B.R. et al. Increased NADPH concentration obtained by metabolic engineering of the pentose phosphate pathway in *Aspergillus niger*. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1313–1325, 2005.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 106, p. 62-70, 2001.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: **Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications**. Heidelberg: Springer Press, p. 21-34, 2001. Edited by S. Meuer, C. Wittwer and K. Nakagawara.

RASMUSSON, A.G. et al. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. **Plant Journal**, v. 20, n. 1, p. 79-87, 1999.

RASMUSSON, A.G.; MØLLER, I.M. Multiple Energy Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria. In: **Plant Physiology online**. charpter 11, 2006. Disponível em: <http://5e.plantphys.net/ >. Acesso em 20 jul. 2010.

RASMUSSON, A.G.; FERNIE, A.R.; VAN DONGEN, J.T. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 383-391, 2009.

RHOADS, D.M. et al. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 357-366, 2006.

RICQUIER, D.; KADER, J-C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 73, n. 3, p. 577-583, 1976.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 3-10, 2000.

RIZZETTO, L.; CAVALIERI, D. Friend or foe: using systems biology to elucidate interactions between fungi and their hosts. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 10, 2011.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 275-288, 2011.

RUSTIN, P.; JACOBS, H.T. Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 362-370, 2009.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplificatin of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCHERER, M. et al. *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (cpea) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 725-735, 2002.

SEILER, S.; JUSTA-SCHUCH, D. Conserved components, but distinct mechanisms for the placement and assembly of the cell division machinery in unicellular and filamentous ascomycetes. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1058-1076, 2010.

SELLEM, C.H. et al. Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. **Genetics**, v. 182, p. 69–78, 2009.

SHINGU-VAZQUEZ, M.; TRAVEN, A. Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1376-1383, 2011.

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

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

SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Letters**, v. 294, n. 3, p. 158-162, 1991.

SLUSE, F.E. et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 480–485, 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS. **User's guide**. Versão 8.0. Cary: SAS Institute, 1999. (CD-ROM).

ST-PIERRE, J. et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 44784–44790, 2002.

SUGUI, J.A. et al. Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2655, 2008.

SUZUKI, T. et al. Alternative oxidase (AOX) genes of african trypanosomes: phylogeny and evolution of AOX and plastid terminal oxidase families. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 374–381, 2005.

SWIDA, A. et al. Fatty acid efficiency profile in uncoupling of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 109-115, 2007.

TAKASUKA, T. et al. Aspergillus fumigatus catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23, p. 125-133, 1999.

TEKAIA, F.; LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 385-392, 2005.

TISCHNER, R.; PLANCHET, E.; KAISER, W.M. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. **FEBS Letters**, v. 576, p. 151–155, 2004.

THÖN, M. et al. The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 282, n. 37, p. 27259-27269, 2007.

TSUGE, H.; NATSUAKI, O.; OHASHI, K. Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biochemistry**, v. 78, p. 835-843, 1975.

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

TURRENS, J.F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 237, p. 408–414, 1985.

TURTON, H.E.; DAWES, I.W.; GRANT, C.M. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 1096-1101, 1997.

UNDEN, G.; BOGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1320, p. 217–234, 2006.

UYEMURA, S.A. et al. Oxidative phosphorylation, Ca^{2+} transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9709-9715, 2000.

VAN BURIK, J.A.H. et al. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Medical Mycology**, v. 36, p. 299-303, 1998.

VANLERBERGHE, G.C.; CVETKOVSKAA, M.; WANGA, J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 392-406, 2009.

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

VERCESI, A.E. et al. PUMPing plants. **Nature**, v. 375, p. 24, 1995.

VOLLING, K. et al. Phagocytosis of melanized Aspergillus conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. **Cellular Microbiology,** v. 13, n. 8, p. 1130-1148, 2011.

WAGNER, A.M.; MOORE, A.L. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defense mechanism. **Bioscience Report**, v. 17, n. 3, p. 319-333, 1997.

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

WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000. Supplement I.

WILLGER, S.D. et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathogens**, v.4, n. 11, e1000200, 2008.

WILLIAMS, B.A.P. et al. A broad distribution of the alternative oxidase in microsporidian parasites. **PLoS Pathogens**, v.6, n.2, e1000761, 2010.

WILSON, R.; TURNER, A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, p. 165-185, 1992.

WONG, C.M; WONG, K.H.; CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbilogy and Biotechnology**, v. 78, p. 27-938, 2008.

WOOD, Z.A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, n.1, p. 32-40, 2003.

YAGI, T. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, n. 2, p. 211-225, 1991.

YAGI, T. et al. NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, p. 233–242, 2001.

Yang, F. et al. The role of *sho1* in polarized growth of *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathologia**, v. 172, p. 347-355, 2011.

YUAN, J.S.; ANG, D.; STEWART JR., N. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 112-123, 2008.

ZHANG, X. et al. The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 8, p. 3622-3630, 2008.

APÊNDICES

1 - Soluções, tampões e meios de cultivo

1.1 Solução de elementos traços

$ZnSO_4.7H_2O$..... 11,0 g

H_3BO_3..... 5,5 g

$MnCl_2.4H_2O$..... 2,5 g

$FeSO_4.7H_2O$..... 2,5 g

$CoCl_2.5H_2O$ ..... 0,8 g

$CuSO_4.5H_2O$ ..... 0,8 g

$(NH_4)Mo_7O_{24}.4H_2O$..... 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.

1.2 Salina fosfato tamponada (PBS) / Tween 20

NaCl ..... 8,0 g

KCl ..... 0,2 g

Na_2HPO_4 ..... 1,15 g

KH_2PO_4 ..... 0,2 g

Água destilada q.s.p..... 1.000,00 mL

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada, sendo a solução ajustada para pH 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120ºC e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos. Quando necessário, após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado Tween 20 na proporção de 0,01% (v/v).

1.3 Solução dextrose-hepes

Dextrose ..... 2% (p/v)

Na-Hepes..... 10 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água Milli-Q, sendo a solução ajustada para pH 7,2. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120ºC e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos.

1.4 Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS) 10X

MOPS ..... 0,2 mol/L

Acetato de sódio ..... 0,08 mol/L

EDTA .... 0,01 mol/L

Os reagentes foram dissolvidos em água Milli-Q acrescida de dietil pirocarbonato (DEPC) 0,05% autoclavada. Seu pH foi ajustado entre 6,6 e 7,8 e a solução foi autoclavada a 120ºC e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos, sendo mantida ao abrigo da luz.

1.5 Tampão de amostra (para RNA)

Azul de Bromofenol..... 0,25% (p/v)

Xileno Cianol FF ..... 0,25% (p/v)

Glicerol ..... 50% (v/v)

EDTA pH 8,0 ..... 1 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água Milli-Q autoclavada acrescida de dietil pirocarbonato (DEPC) 0,05% (v/v). Seu pH foi ajustado para pH 8,0.

1.6 Solução desnaturante para amostra de RNA

Formaldeído..... 3,3 µL

Formamida..... 10 µL

MOPS 10X ..... 2 µL

Tampão de amostra ..... 1 µL

Para cada 10 µg de RNA foram adicionados os reagentes descritos acima. Em seguida, a amostra foi incubada por 10 minutos a 70ºC para posterior aplicação em gel de agarose 1,2% (p/v) acrescido de 2,2 mol/L de formaldeído.

1.7 Tampão de extração de proteína

Tris-HCl 20 mM pH 8,0 ..... 10 mL/4 g de massa celular seca

PIC ..... 1 mL/20 g de massa celular seca

PMSF ..... 1 mmol/L

Glicerol (solução 50%) ..... 10% (v/v)

Após a determinação da massa de cada amostra, os componentes do tampão foram adicionados um a um sobre as células rompidas.

1.8 Meio de cultivo YG

Dextrose..... 2% (p/v)

Extrato de Levedura..... 0,5% (p/v)

Solução de Elementos Traços ..... 0,1% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada para pH 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120ºC e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos. Para o meio sólido YAG foi acrescentado antes da autoclavagem 2% (p/v) de ágar. O meio YG utilizado nos ensaios de exposição do fungo aos pró-oxidantes foi preparado sem a adição da dextrose, a qual foi adicionada após a autoclavagem. Nele também foi adicionado KH_2PO_4 100 mmol/L como agente tamponante.

2 - Padronização do uso de glicose oxidase para formação de peróxido de hidrogênio em meio de cultura

Um dos objetivos desse trabalho é avaliar a diferença de expressão gênica de *A. fumigatus* na presença de agentes pró-oxidantes geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio.

Uma das formas de expor o fungo a esta ERO é através da adição da mesma ao meio de cultura onde se encontra o microrganismo. Entretanto, são encontradas três catalases funcionais em *A. fumigatus* que promovem eficiente degradação do peróxido de hidrogênio. Esta é uma limitação quando se quer expor o fungo a 8 horas de contato com esta espécie reativa, uma vez que sua concentração cai conforme o passar do tempo. A presença de um sistema de geração contínua de peróxido de hidrogênio é fundamental para que a concentração de peróxido se mantenha próxima à concentração inicial, mesmo com a detoxificação por *A. fumigatus.* Sendo assim, optou-se por adicionar glicose oxidase ao meio de cultura com o fungo.

A glicose oxidase de *A. niger* catalisa a oxidação da β-D-glucose em D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio (WILSON; TURNER, 1992). A D-gluconolactona, espontaneamente ou através de atividade enzimática (lactonase) pode ser convertida a ácido glucônico, que se acumula, reduzindo o pH da solução. Este produto e o próprio peróxido formado podem inibir a atividade da glicose oxidase (BAO et al, 2001; MIRON et al, 2004; WONG, WONG & CHEN, 2008). Portanto, para garantir a atividade do sistema glicose oxidase foram necessárias as determinações do pH da cultura, do consumo da glicose presente no meio pela enzima e da formação de peróxido de hidrogênio durante a padronização.

Culturas de *A. fumigatus* cepa CEA 17 foram incubadas com glicose oxidase 40 um/mL, sendo mantidas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, nos quais foram verificados o consumo de glicose pela enzima, o pH da cultura e a formação de peróxido de hidrogênio e degradação do mesmo pelo fungo.

2.1 Avaliação do consumo de glicose pela glicose oxidase

O consumo de glicose do meio pela atividade da enzima e por *A. fumigatus* foi determinado através da variação da concentração de glicose encontrada no meio de cultura em relação à concentração inicial (tempo 0 hora).

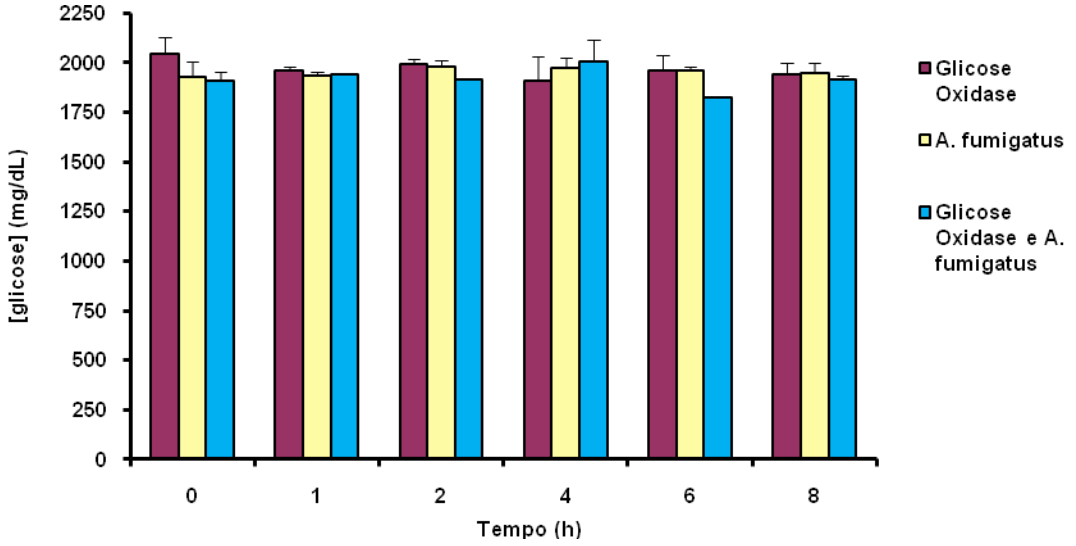


Figura 1 - Consumo de glicose por glicose oxidase, *A. fumigatus* cepa CEA17 e glicose oxidase e *A. fumigatus.*

As diferentes situações testadas apresentaram pequenas variações na concentração de glicose resultante independente do tempo de incubação (Figura 1). No meio contendo glicose oxidase e *A. fumigatus*, por exemplo, a concentração de glicose atingiu o máximo em 4 horas, e o mínimo em 6 horas, havendo uma variação

aparentemente aleatória durante as medições. Esses resultados sugerem que não há uma tendência clara de variação no consumo de glicose nas diferentes situações.

2.2 Avaliação do pH da cultura durante a atividade da glicose oxidase

Ao se utilizar o meio de cultura YG pH 7,0 para este ensaio, observou-se queda no pH das amostras contendo glicose oxidase (na ausência ou presença de fungo). Os valores ficaram próximos a 4,5 após 6 horas de incubação (dado não mostrado). Ao se utilizar como agente tamponante KH_2PO_4 100 mmol/L, o pH não foi menor que 5,4 durante todo o ensaio (Figura 4), garantindo a atividade da glicose oxidase e a sobrevivência do fungo. Assim, em todos os ensaios na presença de glicose oxidase foi utilizado o meio YG tamponado. Isto se fez importante porque a faixa de pH necessária para a atividade da enzima está entre 4,0 e 7,0 (BAO et al, 2001). Além disso, a manutenção das mesmas condições para o desenvolvimento de *A. fumigatus* nas amostras com e sem glicose oxidase é fundamental para a comparação das amostras e análise dos resultados.

No meio contendo glicose oxidase houve uma redução gradual do pH até 6 horas, havendo um ligeiro aumento em 8 horas de incubação (Figura 2). Diferentemente, o meio apenas com *A. fumigatus* não apresentou variação significativa em seu pH durante todo o ensaio. Por outro lado, a presença de glicose oxidase no meio com o fungo promoveu queda dos valores de pH, porém menor que o observado em meio apenas com a enzima, sugerindo assim que, a formação do ácido glucônico resultante da degradação da glicose, seja o fator responsável pela acidificação do meio.

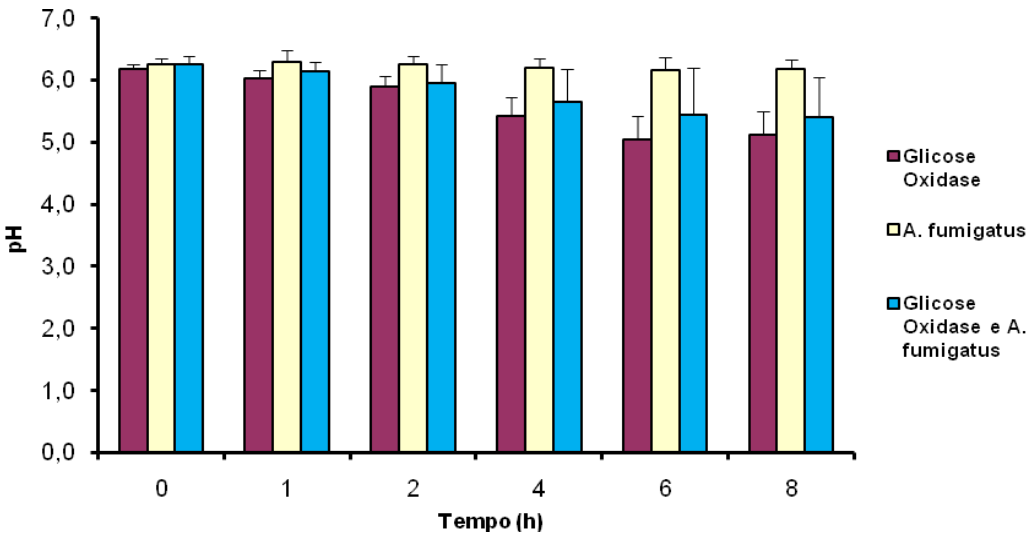


Figura 2 - Valores de pH do meio na presença de glicose oxidase, *A. fumigatus* cepa CEA17 e glicose oxidase e *A. fumigatus.*

2.3 Avaliação da degradação do peróxido de hidrogênio por *A. fumigatus* durante a atividade da glicose oxidase

A formação de peróxido de hidrogênio pela ação da glicose oxidase foi quantificada relativamente por fluorimetria pela medida da formação de resorufina. A fluorescência do meio de cultura e das amostras foi calculada pela diferença entre os valores finais e os valores iniciais obtidos durante o período de leitura das amostras pelo equipamento (120 segundos). Em seguida, o valor resultante do meio de cultura foi subtraído dos valores das amostras, fornecendo a fluorescência resultante. Esse procedimento foi realizado para as alíquotas retiradas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas. A amostra contendo apenas glicose oxidase no tempo de zero hora foi utilizada como valor de referência para a determinação da porcentagem das outras amostras.

A intensidade de fluorescência no meio contendo glicose oxidase decresceu em função do tempo para todas as amostras (Figura 3), cessando para as que continham apenas glicose oxidase após o tempo de 2 horas. O desvio padrão foi

maior para os níveis de menor intensidade de fluorescência. No meio contendo glicose oxidase e *A. fumigatus*, o decréscimo na intensidade de fluorescência foi maior e mais uniforme. Ainda assim, o desvio padrão também foi maior quando a intensidade de fluorescência apresentou níveis menores. Adicionalmente, observa-se que, em média, a porcentagem da intensidade de fluorescência no meio contendo glicose oxidase e *A. fumigatus* é menor do que a apresentada no meio apenas com a enzima.

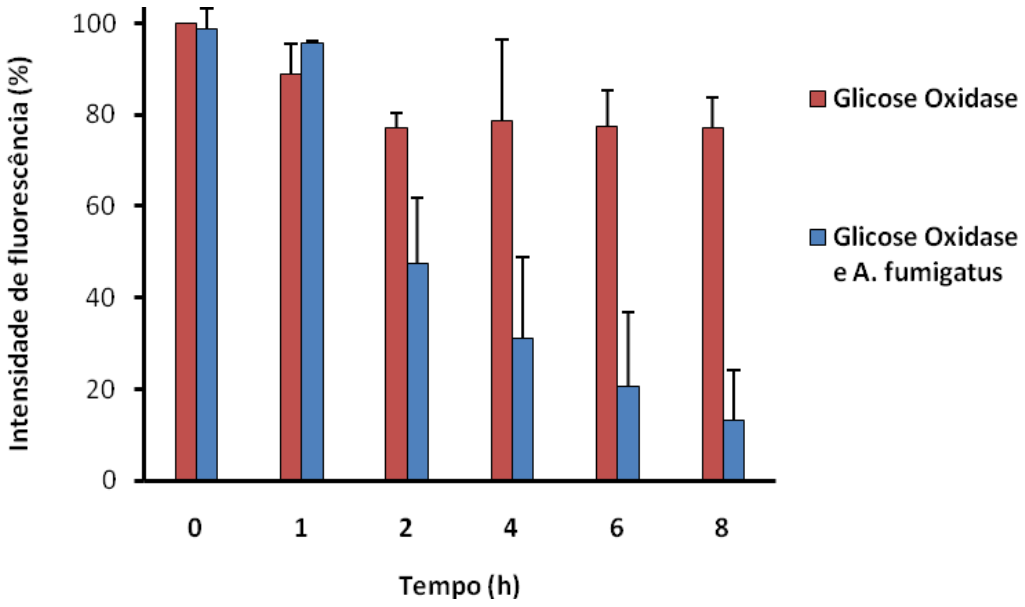


Figura 3 - Intensidade de fluorescência de acordo com a formação de peróxido de hidrogênio pela glicose oxidase e da degradação do mesmo por *A. fumigatus*.

3 - Padronização da concentração de sonda FUN®1

Para a utilização de FUN®1 foi necessária a otimização de sua concentração de uso. Assim, foram testadas as concentrações de 5; 2,5; 2; 1,5 e 1 µmol/L sem e com a adição de PI 0,5 µmol/L nas cepas CEA17 e ΔAOX sem nenhum tipo de tratamento (controles). O critério para a escolha da melhor concentração de uso foi a maior intensidade de fluorescência com a marcação do maior número de células, sem ultrapassar a escala limite do filtro ótico utilizado.

A melhor marcação obteve-se com a concentração de FUN®1 em 2,5 µmol/L, tanto para a cepa CEA17 quanto para ΔAOX, uma vez que 98,2% das células da cepa CEA17 (Figura 4 A) e 97,4% das células da cepa ΔAOX (Figura 4 B) encontraram-se representadas no quadrante Q4 (metabolicamente ativas). Isto indica que o fluorocromo utilizado conseguiu marcar o maior número de células viáveis sem perdas de intensidade de fluorescência.

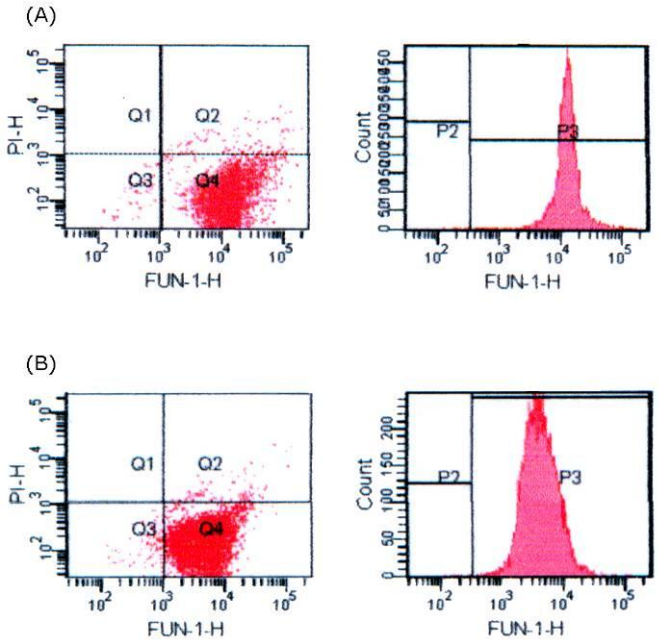


Figura 4 - Padronização da concentração de FUN®1 utilizada em citometria de fluxo para *A. fumigatus* cepas CEA17 (A) e ΔAOX (B). As figuras mostram os resultados obtidos com 2,5 µmol/L de sonda FUN®1.

Para a padronização da metodologia, características celulares como volume e complexidade interna foram inicialmente determinadas para cada cepa. A Figura 5 A e B corresponde às características das cepas CEA17 e ΔAOX, respectivamente.

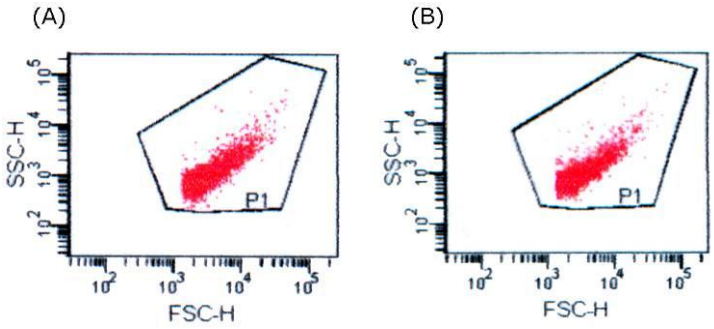
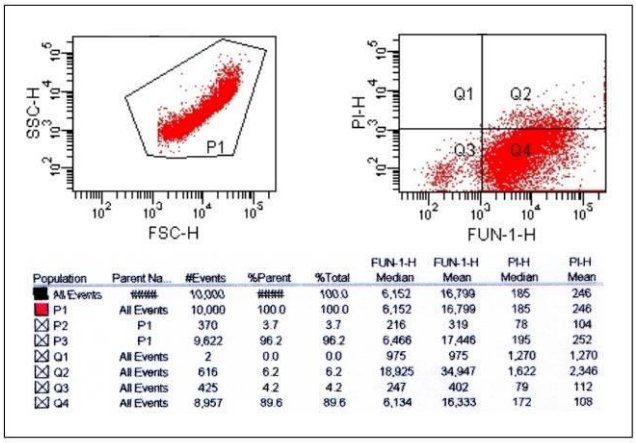


Figura 5 - Volume (FSC-H) e complexidade celular (SSC-H) de *A. fumigatus* cepas CEA17 (A) e ΔAOX (B).

4 - Histogramas das análises de citometria de fluxo de *A. fumigatus*

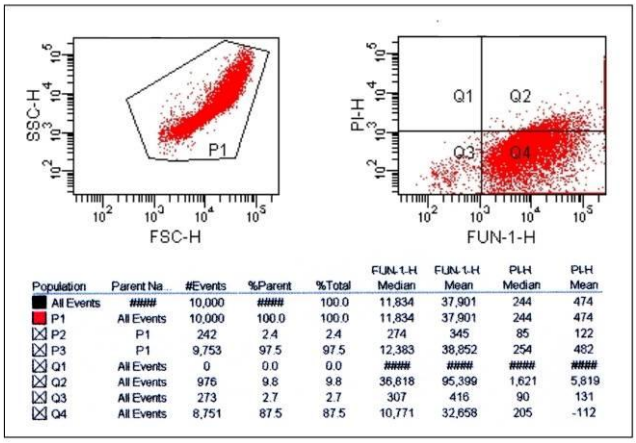
4.1 *A. fumigatus* CEA17

(A)



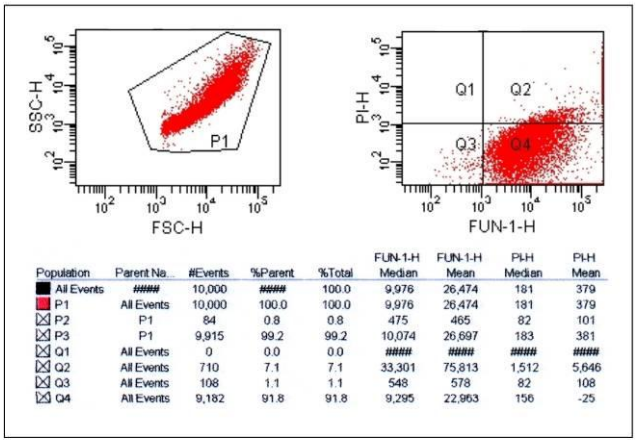
Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	6,152	16,799	185	246
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	6,152	16,799	185	246
P2	P1	370	3.7	3.7	216	319	78	104
P3	P1	9,622	96.2	96.2	6,466	17,446	195	252
Q1	All Events	2	0.0	0.0	975	975	1,270	1,270
Q2	All Events	616	6.2	6.2	18,925	34,947	1,622	2,346
Q3	All Events	425	4.2	4.2	247	402	79	112
Q4	All Events	8,957	89.6	89.6	6,134	16,333	172	108

(B)



Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	11,834	37,901	244	474
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	11,834	37,901	244	474
P2	P1	242	2.4	2.4	274	345	85	122
P3	P1	9,753	97.5	97.5	12,383	38,852	254	482
Q1	All Events	0	0.0	0.0	####	####	####	####
Q2	All Events	976	9.8	9.8	36,818	95,399	1,621	5,819
Q3	All Events	273	2.7	2.7	307	416	90	131
Q4	All Events	8,751	87.5	87.5	10,771	32,658	205	-112

(C)

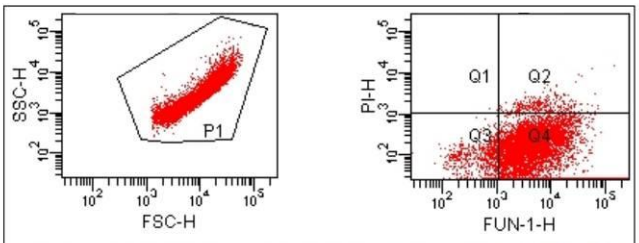


Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	9,976	26,474	181	379
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	9,976	26,474	181	379
P2	P1	84	0.8	0.8	475	465	82	101
P3	P1	9,915	99.2	99.2	10,074	26,697	183	381
Q1	All Events	0	0.0	0.0	####	####	####	####
Q2	All Events	710	7.1	7.1	33,301	75,813	1,512	5,646
Q3	All Events	108	1.1	1.1	548	578	82	108
Q4	All Events	9,182	91.8	91.8	9,295	22,963	156	-25

Figura 6 - Análises de *A. fumigatus* cepa CEA17 na presença de menadiona (A), paraquat (B) e glicose oxidase (C). Cada agrupamento (A, B e C) mostra três conjuntos de dados: população de germinantes com as características *FSC* e *SSC* (gráfico à esquerda); incorporação das sondas fluorescentes FUN®1 e PI (gráfico à direita); parâmetros correspondentes à população celular adquirida na determinação da viabilidade celular (tabela).

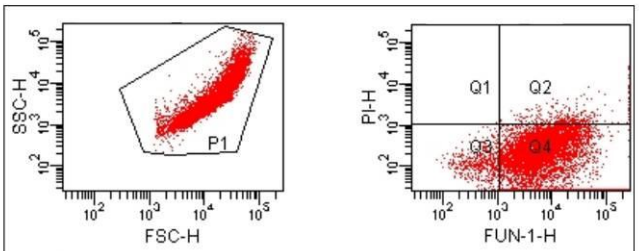
4.2 *A. fumigatus* Δ*aoxA*

(A)



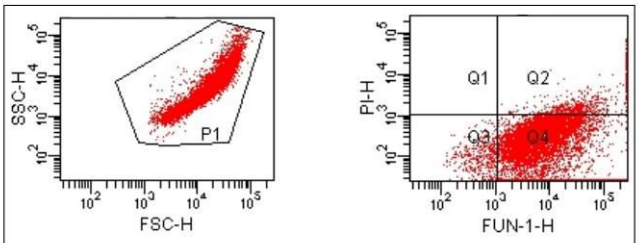
Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	3,986	9,345	109	90
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	3,986	9,345	109	90
P2	P1	515	5.1	5.1	490	477	87	104
P3	P1	9,460	94.6	94.6	4,246	9,850	113	90
Q1	All Events	2	0.0	0.0	853	853	1,304	1,304
Q2	All Events	315	3.2	3.2	6,354	10,527	1,579	1,863
Q3	All Events	692	6.9	6.9	647	602	88	108
Q4	All Events	8,991	89.9	89.9	4,259	9,979	106	27

(B)



Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	8,505	22,069	135	-63
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	8,505	22,069	135	-63
P2	P1	421	4.2	4.2	471	475	112	140
P3	P1	9,570	95.7	95.7	9,086	23,038	140	-72
Q1	All Events	2	0.0	0.0	963	963	1,129	1,129
Q2	All Events	326	3.3	3.3	20,067	47,376	1,408	2,316
Q3	All Events	500	5.0	5.0	536	553	113	146
Q4	All Events	9,172	91.7	91.7	8,923	22,347	128	-159

(C)



Population	Parent Na...	#Events	%Parent	%Total	FUN-1-H Median	FUN-1-H Mean	PI-H Median	PI-H Mean
All Events	####	10,000	####	100.0	8,278	23,728	186	199
P1	All Events	10,000	100.0	100.0	8,278	23,728	186	199
P2	P1	343	3.4	3.4	499	508	98	127
P3	P1	9,640	96.4	96.4	8,772	24,594	195	201
Q1	All Events	0	0.0	0.0	####	####	####	####
Q2	All Events	568	5.7	5.7	32,456	69,127	1,532	4,036
Q3	All Events	418	4.2	4.2	579	588	101	129
Q4	All Events	9,014	90.1	90.1	8,174	21,940	176	-40

Figura 7 - Análises de *A. fumigatus* cepa Δ*aoxA* em presença de menadiona (A), paraquat (B) e glicose oxidase (C). Cada agrupamento (A, B e C) mostra três conjuntos de dados: população de germinantes com as características *FSC* e *SSC* (gráfico à esquerda); incorporação das sondas fluorescentes FUN®1 e PI (gráfico à direita); parâmetros correspondentes à população celular adquirida na determinação da viabilidade celular (tabela).