



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da
translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de
*Aspergillus fumigatus***

Dhára Cavalcanti de Oliveira

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da
translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de
*Aspergillus fumigatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientada: Dhára Cavalcanti de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Ribeirão Preto

2021

LOMBADA

OLIVEIRA, D.C.	Expressão heteróloga em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCRPUSP 2021
----------------	--	---	-----------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Cavalcanti de Oliveira, Dhára

Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2021.
94p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia
Orientador: Uyemura, Sérgio Akira.

1. Mitocôndria. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3. Tom20. 4. Expressão heteróloga. 5. *Saccharomyces cerevisiae*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dhára Cavalcanti de Oliveira

Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Sérgio Akira Uyemura.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Yara C. S. Cavalcanti e João Ramos de Oliveira, por todo amor, companheirismo, apoio e cuidado. Obrigada por embarcarem comigo, com tanto amor, nessa jornada chamada vida. Vocês são meu ponto de paz e meu lar. São vocês que me dão forças todos os dias para continuar. Tudo isso é por vocês. Espero um dia orgulhá-los, assim como me orgulho de vocês, e poder retribuir tudo que fazem por mim. Amo vocês.

Aos meus avós, Maria Luíza da Silva Cavalcanti, Álvaro Mendonça Cavalcanti e Francisca Malaquias de Jesus, por sempre cuidarem de mim, e estarem ao meu lado apesar da distância física. Obrigada por me fazerem sentir amada e abraçada sempre que conversamos, e por me ensinarem tanto sobre a vida. Sou muito grata a Deus por ser sua neta e tenho muito orgulho de vocês. Amo vocês.

À minha madrinha Liliane da Silva Godoy (in memoriam). Obrigada por ter existido em minha vida, por ter cuidado de mim como sua filha do coração e por ter sido minha segunda mãe. Sei que sempre estará ao meu lado e olhando por mim. Nunca te esquecerei. Saudades e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, por confiar em mim e por ter aceitado me orientar. Agradeço por me receber em seu laboratório, por todos os ensinamentos e conselhos, por toda ajuda e críticas construtivas, pela paciência, empatia, e respeito. Saiba que o senhor contribuiu muito para que eu crescesse pessoalmente e profissionalmente. Vou me esforçar para ser uma profissional cada vez melhor, tendo no senhor um exemplo a ser seguido.

À Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco pelos ensinamentos, prontidão e colaboração na realização deste trabalho. E também a todos os membros e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Proteínas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por toda ajuda, apoio, incentivo e bons momentos.

À Profa. Dra. Tathiane M. Malta Pereira por toda colaboração, apoio, preocupação, incentivo, empatia e discussões científicas.

Ao Ms. Emerson S. Santos e a Júlia Roza, por toda ajuda na realização dos experimentos, por todas as discussões científicas, apoio, paciência e companheirismo. Agradeço por terem se tornado amigos tão importantes para mim.

A Ms. Juliana Y. Sakita, por toda ajuda na realização dos experimentos, pelas discussões pertinentes e pela paciência. Agradeço por ser muito mais do que uma colega de trabalho, por ter me apoiado e acolhido tão bem mesmo antes de me conhecer. Sou grata a ela e ao André Ozawa, por serem meus grandes amigos, por fazer de sua casa a minha segunda casa em Ribeirão Preto, e por terem me dado forças nos momentos difíceis.

Ao Dr. Lucas O. Souza e ao João J. Franco, por todo auxílio, discussões pertinentes, paciência, convivência harmoniosa e bons momentos.

Aos meus irmãos Charlie Bernardino Ramos de Oliveira e Khaê Cavalcanti de Oliveira, por todo amor, preocupação, companheirismo, amizade e cuidado durante toda a vida.

Aos amigos Natália J. Insfran, Ana Paula M. Andrade, Lucas D. R. dos Santos e Lucas V. P. de Freitas, por toda amizade e apoio. Agradeço por terem estado sempre ao meu lado, me ajudando a permanecer firme durante a realização deste trabalho.

À toda coordenação, docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pela atenção, persistência, dedicação, ética, e comprometimento com o ensino e com a pesquisa mesmo em momentos tão difíceis como estes.

À Deus, pois sem a permissão Dele eu não seria nada, eu não teria nada, eu não poderia nada. Por estar sempre comigo, proteger, cuidar, amar e amparar a mim e meus entes queridos durante toda a minha vida, não sendo diferente durante a pandemia do Covid-19. A Nossa

Senhora Aparecida, por interceder por mim e pela minha família perante a Deus e a Jesus Cristo.

À todos aqueles familiares, amigos e colegas de trabalho que, apesar de não citados, contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número do Processo: 2019/02598-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

*“A luz de Deus me guia. O amor de Deus me envolve.
O poder de Deus me protege. A presença de Deus zela por mim.
Onde eu estou, Deus aí está. Amém!”*

Oração pela Proteção - James Freeman.

RESUMO

OLIVEIRA, D.C. **Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*.** 2021. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo encontrado em todas as regiões no mundo. Nos últimos anos, o *A. fumigatus* deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância, para se tornar um dos principais agentes patogênicos oportunistas em pacientes imunossuprimidos. A atividade mitocondrial está diretamente relacionada com o processo de germinação dos conídios deste fungo. As mitocôndrias apresentam duas membranas: a membrana mitocondrial externa e a interna. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear, sendo endereçadas para as mitocôndrias após a sua síntese no citosol. Os complexos mitocondriais TOM (translocases de membrana mitocondrial externa) e TIM (translocases de membrana mitocondrial interna) são responsáveis por reconhecer e endereçar estas proteínas para os diferentes compartimentos mitocondriais. Um dos componentes do complexo TOM é a subunidade Tom20, cuja função ainda não foi descrita em *A. fumigatus*. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a função do gene *tom20* de *A. fumigatus* através da expressão heteróloga deste em *Saccharomyces cerevisiae tom20^{+/-}*. Para isso, o gene *Aftom20* foi clonado em vetor pYES2/CT pela técnica CPEC. Posteriormente, a levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* foi transformada com a construção *pYES2/Aftom20*. A seguir, foi realizada a indução da expressão do gene *Aftom20* nesta levedura, sendo tal expressão confirmada por PCR quantitativo em tempo real. A presença da proteína recombinante nas mitocôndrias da levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20* foi confirmada por Western Blotting. A sequência deduzida de aminoácidos desta proteína foi analisada apresentando 211 aminoácidos. Ao comparar a taxa de crescimento da levedura que expressava a proteína recombinante, com a daquela que não a expressava, foi constatado que não há diferença entre os crescimentos destas leveduras em meio fermentável. A medida do potencial de membrana mitocondrial de esferoplastos recombinantes de *S. cerevisiae tom20^{+/-}*, evidenciou que nestes, o NADH induziu a formação de um potencial de membrana mitocondrial maior do que nos esferoplastos que não expressavam a proteína recombinante. Além disso, estes últimos não foram capazes de realizar a fosforilação de ADP. Assim, estes resultados sugerem que a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* possui função importante para a atividade mitocondrial, por realizar o reconhecimento de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase, possibilitando seu transporte para as mitocôndrias.

Palavras-chave: Mitocôndria. *Aspergillus fumigatus*. Tom20. Expressão heteróloga. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D.C. **Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of external mitochondrial membrane translocase TOM20 from *Aspergillus fumigatus***. 2021. 94f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aspergillus fumigatus is a fungus found in all regions of the world. In recent years, *Aspergillus fumigatus* is no longer just a low importance saprophytic fungus, but has become one of the main opportunistic pathogens in immunocompromised patients. The mitochondrial activity is directly related to with the conidial germination processes of this fungus. Mitochondria have two membranes: the outer and inner mitochondrial membrane. Most mitochondrial proteins are encoded by nuclear DNA, which are addressed to mitochondria after their synthesis in cytosol. The mitochondrial complexes TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane) and TIM (translocase of the inner mitochondrial membrane) are responsible for recognize and address these proteins to the different mitochondrial compartments. One of TOM complex components is Tom20 subunit, but its function has not yet been described in *A. fumigatus*. Thus, the objective of this work was to study the function of *A. fumigatus tom20* gene through its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae tom20^{+/-}*. In this sense, the *Aftom20* gene was cloned into pYES2/CT vector by CPEC technique. Subsequently, the *S. cerevisiae tom20^{+/-}* yeast was transformed with *pYES2/Aftom20* construction. Then, the expression of *Aftom20* gene was induced in this yeast, and this expression was confirmed by quantitative real-time PCR. The presence of recombinant protein in the transformed yeast mitochondria with *pYES2/Aftom20* construction was confirmed by Western Blotting. The deduced amino acid sequence of this protein was analyzed, and it has 211 amino acids. The comparison between the growth rate of the yeast that expressed the recombinant protein with the growth rate of the yeast that did not express it, showed that there is no difference between the growth of these yeasts in fermentable medium. The measuring the mitochondrial membrane potential of *S. cerevisiae tom20^{+/-}* recombinant spheroplasts, evidenced that NADH induced the formation of a higher mitochondrial membrane potential in these spheroplasts than in those that did not express the recombinant protein. Furthermore, this last one was not able to carry out ADP phosphorylation. Therefore, these results suggest that the recombinant Tom20 protein from *A. fumigatus* has an important role in mitochondrial activity, performing the recognition of electron carrier chain proteins and the ATP-synthase, enabling their transport to the mitochondria.

Keywords: Mitochondria. *Aspergillus fumigatus*. Tom20. Heterologous expression. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização geral dos complexos TOM e TIM na membrana mitocondrial externa (OM) e membrana interna (IM).....	15
Figura 2 - Eletroforese do RNA total em gel de agarose, sob condições desnaturante.....	36
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos de PCR para padronização dos <i>primers</i> da Tabela 1.....	37
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> a partir do cDNA.....	38
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pET-28a digerido e purificado.....	39
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pET-28a.....	40
Figura 7 - Resultado do sequenciamento do gene <i>Aftom20</i> , comparando com a sequência do mRNA presente no banco de dados do NCBI.....	41
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos de PCR para padronização dos <i>primers</i> da Tabela 2.....	42
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i>	43
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pYES2/CT digerido e purificado.....	44
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pYES2/CT.....	45
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> , para confirmação da transformação da levedura.....	46
Figura 13 - Expressão relativa do gene <i>Aftom20</i>	47

Figura 14 - Expressão relativa do gene <i>tom20</i> de <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 15 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti - V5	49
Figura 16 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti-V5, identificada a partir das proteínas mitocondriais.....	50
Figura 17 - Proteína mitocondrial constitutiva VDAC marcada com o anticorpo Anti-VDAC.....	50
Figura 18 - Sequência de aminoácidos deduzidos da proteína recombinante..	51
Figura 19 - Alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das proteínas Tom20 de <i>S. cerevisiae</i> e de <i>N. crassa</i> , com a sequência primária de aminoácidos deduzidos da proteína Tom20 de <i>A. fumigatus</i>	52
Figura 20 - Curva de crescimento em meio SC-URA ⁻ líquido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformadas.....	53
Figura 21 - Crescimento em meio SC-URA ⁻ sólido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformadas.....	54
Figura 22 - Titulação do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformados com a construção <i>pYES2/Aftom20</i>	55
Figura 23 - Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em esferoplastos de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformados.....	56
Figura 24 - Gráfico de predição de hélices transmembranares de acordo com MEMSAT-SVM.....	92
Figura 25 - Gráfico de predição de peptídeo sinal de acordo com SignalP 5.0.	93
Figura 26 - Mapa do vetor pET-28a(+).	93
Figura 27 - Mapa do vetor pYES2/CT.....	94
Figura 28 - Análise por densitometria da banda gerada pela proteína recombinante Tom20 através do software ImageJ®, normalizada com relação à intensidade da banda gerada pela proteína VDAC.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a realização da clonagem em vetor pET-28a.....	21
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a realização da clonagem em vetor pYES2/CT.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
<i>Aftom20</i>	Gene <i>tom20</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i>
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAE	Formamida-EDTA

FCCP	Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
H+	Próton
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazini] etanosulfônico
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
kgf	Quilograma força
LB	Lúria Bertani
LiAc	Acetato de lítio
mA	Miliamper
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolts
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nde	NADH desidrogenase alternativa externa
NDH	NADH desidrogenase alternativa
Ndi	NADH desidrogenase alternativa interna
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OLIGO	Oligomicina
OXA	Translocase de montagem de oxidase
pb	Pares de bases

PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poli(etil)enoglicol
PIC	Coquetel Inibidor de Protease
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p/v	Relação peso por volume
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
SC-URA⁻	Meio de cultura Sc sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS
SHAM	Ácido salicilhidroxâmico
TAE	Tris- acetato-EDTA
TB	“Terrific Broth”
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TE	Tris-EDTA
TIM	Translocase de membrana mitocondrial interna
T_m	Temperatura de melting
TMD	Domínio transmembranar
TMPD	N,N,N',N'- tetrametil-p-fenilenediamina
TOM	Translocase de membrana mitocondrial externa
TPR	Tetratricopeptídeo

Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UCP	Proteína desacopladora
URA3	Oritidina 5'-descarboxilase
V	Volts
VDAC	Proteína do canal seletivo de ânions dependente de voltagem
v/v	Relação volume por volume
°C	Graus Celsius
Δp	Força próton motora
ΔpH	Gradiente químico
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da massa do inserto a ser utilizado na CPEC.....	22
Equação 2 - Equação de Nernst.....	34

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
LISTA DE EQUAÇÕES	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 Características macro e microscópicas	3
1.3 Patogênese	4
1.4 Mitocôndrias.....	6
1.5 Componentes da cadeia transportadora de elétrons.....	8
1.6 Complexos TOM/TIM.....	10
1.7 Expressão Heteróloga.....	14
2. CONCLUSÕES	16
3. REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aspergillus fumigatus*

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico que pode ser encontrado em todas as regiões do mundo. Este fungo está presente na matéria orgânica em decomposição, sendo o solo seu nicho ecológico natural, onde ele participa da reciclagem de carbono e de nitrogênio (DENNING, 1998; BRAKHAGE et al., 2002; TEKAIA; LATGÉ, 2005). Alguns estudos do genoma deste fungo demonstraram que a maioria das enzimas codificadas estão mais associadas a fungos que degradam plantas, em comparação com aqueles que degradam matéria orgânica animal (VAN DE VEERDONK et al., 2017). Há muito tempo, espécies do gênero *Aspergillus* estão sendo estudadas e utilizadas como recurso biotecnológico para produzir ingredientes alimentícios, produtos farmacêuticos e enzimas (MEYER et al., 2011; ARASTEHFAR et al., 2021).

Os micélios de *A. fumigatus* possuem uma vida curta em laboratório. Entretanto, embora este fungo não cresça em temperaturas menores que 12°C, seus conídios resistem por um longo período a tensões causadas pelo congelamento e também a longos períodos de desidratação. Em nitrogênio líquido, por exemplo, os conídios são capazes de sobreviver por até 18 anos. Estes fatos demonstram uma das principais características biológicas do *A. fumigatus*: a capacidade de sobreviver e ser resistente a ambientes hostis (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; HAGIWARA et al., 2017).

Existem algumas propriedades importantes do *A. fumigatus* que permitem que, além de sobreviver a ambientes hostis, ele seja a espécie de *Aspergillus* que mais causa infecções em humanos. Entre estas propriedades está o tamanho microscópico dos conídios, que possibilita sua penetração no sistema do trato respiratório inferior, conseguindo escapar da ação das forças mucociliares (BRAKHAGE; LANGFELDER, 2002; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013). Além disso, a presença em abundância de ácido siálico carregado negativamente na superfície dos conídios auxilia na ligação deste fungo às proteínas da lâmina basal nos pulmões do hospedeiro (WASYLNKA et al., 2001; ARASTEHFAR et al., 2021). Outra propriedade importante, é a presença de melanina em sua parede celular, que confere resistência à fagocitose e às espécies reativas de oxigênio (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; ARASTEHFAR et al., 2021).

Por serem microscópicos, os conídios de *A. fumigatus* são facilmente transportados pelo ar e inalados com frequência pelos seres humanos. Estes esporos são rapidamente

eliminados pelo sistema imunológico de indivíduos imunocompetentes. No entanto, isso geralmente não ocorre em indivíduos imunocomprometidos. Nestes últimos, o *A. fumigatus* é considerado um importante patógeno oportunista (SEGAL, 2009; ABAD et al., 2010; VIVEK-ANANTH et al., 2018). Outras doenças como a tuberculose e a malária possuem uma morbidade maior quando comparadas a aspergilose invasiva. Cerca de 12% e 0,2% dos pacientes morrem por tuberculose e malária, respectivamente, enquanto mais de 50% morrem por aspergilose invasiva (LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

No contexto atual da pandemia COVID-19 (coronavirus disease 2019), causada pelo vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2), o *A. fumigatus* têm sido associado a essa doença. Recentemente, foram publicados relatos de casos relacionando a infecção por esse fungo em pacientes com pneumonia viral grave causada pelo SARS-CoV-2. Do mesmo modo, tem sido investigado se a infecção por este fungo nestes casos está relacionada com o aumento da mortalidade (KOEHLER et al., 2020; BLAIZE et al., 2020; HELLEBERG et al., 2021). Assim, se torna cada vez mais importante aprofundar os estudos a respeito do *A. fumigatus*.

1.2 Características macro e microscópicas

Quando cultivado em ágar glicose-peptona a 37°C, o crescimento das colônias de *A. fumigatus* ocorre de maneira rápida. Macroscopicamente, tais colônias são geralmente granulares, apresentam uma coloração verde-acinzentada, e produzem abundantes conídios. Em relação a sua micromorfologia, essa espécie possui hifas hialinas septadas com paredes paralelas. Os conídios por sua vez, apresentam 2,5-3 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. As cabeças conidiais possuem aspecto de vesículas em forma de frasco, contendo uma série de fiálides uniseriadas que recobrem dois terços superiores de sua superfície (HAINES, 1995).

O *A. fumigatus* é capaz de se desenvolver em temperaturas superiores a 55°C, sendo considerada uma espécie termo-resistente. Entretanto, ele não é capaz de crescer a 10°C, diferente de outras espécies de *Aspergillus* que não são capazes de crescer a temperatura tão alta, mas são capazes de crescer a 10°C. Além disso, ele também é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de pH. Sendo assim, estas são características que tornam mais fácil a sua diferenciação das outras espécies, e faz com que ele possa ser encontrado globalmente e em diversos ambientes (HAINES, 1995; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; SUGUI et al., 2014).

1.3 Patogênese

Para que o fungo se desenvolva em tecidos hospedeiros, ele deve ser agressivo no momento em que o sistema imune do hospedeiro esteja debilitado. Portanto, o estabelecimento da infecção fúngica tem como principal fator predisponente a imunodeficiência do hospedeiro (LATGÉ; CALDERONE, 2002; DAGENAIS; KELLER, 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2017).

O gênero *Aspergillus* causa várias síndromes clínicas. Mesmo sendo comum a inalação de conídios, uma minoria de indivíduos desenvolverá alguma doença pulmonar. Isso ocorre, pois apesar de ter a capacidade de provocar doenças, geralmente o *A. fumigatus* não coloniza o trato respiratório humano (KOSMIDIS; DENNING, 2015; VAN DE VEERDONK et al., 2017). As características clínicas, evolução e prognóstico das infecções por *Aspergillus* dependem do imunocomprometimento do hospedeiro. Além disso, fatores genéticos têm sido considerados para a doença (KOSMIDIS; DENNING, 2015). Portanto, as infecções fúngicas acometem principalmente indivíduos submetidos a terapias imunossupressoras, ou que possuem doenças que comprometem o sistema imunológico (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; ITO; LYONS, 2002; HOGABOAM et al., 2005; HOHL; FELDMESSER, 2007; KOSMIDIS; DENNING, 2015).

O gênero *Aspergillus* compreende várias espécies oportunistas que podem causar Aspergilose, termo que é utilizado para denominar uma doença causada por agentes deste gênero. Dentre as espécies oportunistas capazes de causar doenças invasivas, estão *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, e o *A. fumigatus*. O *A. fumigatus* é responsável por cerca de 90% dos casos de aspergilose invasiva. As demais espécies que pertencem ao complexo *A. fumigatus* também são capazes de causar aspergilose invasiva, porém com uma menor frequência (LATGÉ, 1999; SHAUKAT et al., 2005; LAMOTH, 2016). A aspergilose invasiva possui uma alta mortalidade, cerca de 30 a 95% dos casos. A inalação dos conídios é a principal forma de infecção por este fungo, acometendo principalmente o trato respiratório (RUF et al., 2018).

Nos pacientes imunocompetentes, as manifestações clínicas mais comuns são as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, que ocorrem por exposição aos conídios ou antígenos do *Aspergillus* sp., sendo ausente a colonização pelo micélio (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; TOMEE; VAN DER WERF, 2001). Por outro lado, em pacientes imunossuprimidos, as manifestações clínicas são consideradas mais graves. As três principais formas mais graves são aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose

invasiva. Essas manifestações por sua vez, envolvem o crescimento e colonização pelo micélio (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; TEKAIA; LATGÉ, 2005; AGARWAL et al., 2010; MAYR; LASS-FLORL, 2011; AGARWAL et al., 2012; AGARWAL; CHAKRABARTI, 2013; TRACY et al., 2016; HUANG et al., 2017). Devido ao crescente número de indivíduos imunossuprimidos, o *A. fumigatus* se apresenta como um dos principais agentes etiológicos responsáveis por mortes infecciosas (LAMOTH, 2016).

Nas infecções invasivas, como a aspergilose pulmonar invasiva, os conídios atingem o epitélio respiratório pela inalação. A seguir, secretam metabólitos secundários, como a gliotoxina, que contribuem para a colonização do tecido pulmonar. (DAGENAIS; KELLER, 2009; ABAD et al., 2010; VIVEK-ANANTH et al., 2018). Posteriormente, ocorrerão lesões granulomatosas nos pulmões e invasão do fungo nos vasos sanguíneos que irrigam este órgão, podendo resultar no surgimento de vasos trombosados. Ao atingir a corrente sanguínea, o fungo poderá se disseminar e afetar órgãos como o encéfalo, rins e o trato gastrointestinal. Desse modo, a forma disseminada da doença geralmente é aguda e fatal (TAUBITZ et al., 2007; KRADIN; MARK, 2008; MCCORMICK et al., 2010; KOEHLER et al., 2014; KIZHAKEDATHIL et al., 2017).

A aspergilose invasiva é a manifestação clínica mais grave causada por *A. fumigatus*, sendo quase sempre fatal se não tratada. Apesar disso, a maior parte dos casos de aspergilose podem ser tratados com anfotericina B, ou com antifúngicos azólicos (SEGAL; WALSH, 2006; VERWEIJ et al., 2015). Apesar de haver uma redução das taxas de mortalidade devido ao surgimento de antifúngicos azólicos como o voriconazol, o isavuconazol (que podem ser utilizados como tratamento de primeira linha), e o posaconazol (que pode ser utilizado como profilaxia), os avanços clínicos estão ameaçados devido ao desenvolvimento da resistência a esses azóis em *A. fumigatus* (TISSOT et al., 2017; JEANVOINE et al., 2020; ARASTEHFAR et al., 2021).

Os relatos do surgimento da resistência a antifúngicos azólicos têm aumentado nos últimos 10 anos (CHOWDHARY et al., 2013; ROCCHI et al., 2015; VERWEIJ et al., 2016; GARCIA-RUBIO et al., 2017; JEANVOINE et al., 2020; ARASTEHFAR et al., 2021). Uma das vias pela qual o *A. fumigatus* pode estar desenvolvendo resistência é através da via adquirida pelo paciente, por meio da terapia azólica por longos períodos. Além desta, outra via conhecida para a aquisição de resistência é a via ambiental, através do uso de compostos azólicos no meio ambiente. Alguns compostos como os fungicidas azólicos, por exemplo, têm sido utilizados na agricultura para proteger plantas e colheitas, prevenir deterioração pós-colheita e para preservar materiais. Estes azóis se mantêm no solo por meses, criando um

ambiente propício para o surgimento de cepas resistentes (VERWEIJ et al., 2016; JEANVOINE et al., 2020). Neste sentido, foi observado que a exposição a alguns fungicidas triazólicos não médicos é capaz de conferir ao *A. fumigatus* uma resistência cruzada aos triazóis médicos (ZHANG et al., 2017).

Em relação à anfotericina B, seu uso é indicado em alguns casos como os de aspergilose crônica, aspergilose do sistema nervoso central, e aspergilose pulmonar invasiva resistente a azóis (VERWEIJ et al., 2015; ASHU et al., 2018). No entanto, além do aumento no número de isolados de *A. fumigatus* resistentes a anfotericina B, quando convencionalmente formulado, o uso deste medicamento pode causar muitos efeitos adversos. Entre os efeitos adversos estão náuseas, febres, calafrios, vômitos, nefrotoxicidade e anemia (TONIN et al., 2017; REICHERT-LIMA et al., 2018; ASHU et al., 2018). Novas formulações de anfotericina B estão sendo criadas, a fim de diminuir os efeitos colaterais ao seu uso. Entretanto, tais formulações a base de lipídios possuem um alto custo, limitando o seu uso na rotina clínica (TONIN et al., 2017).

Para que a infecção pelo *A. fumigatus* evolua para aspergilose invasiva deve ocorrer a germinação dos conídios, que é fundamental para o ciclo celular e para o estabelecimento da infecção. A atividade mitocondrial se encontra ativa desde os estágios iniciais deste processo, produzindo energia em forma de ATP. Dessa forma, a atividade mitocondrial está diretamente relacionada com o processo de germinação dos conídios. Portanto, para melhorar a compreensão sobre a virulência oportunista deste fungo, é necessário aprofundar os estudos sobre seu metabolismo (TAUBITZ et al., 2007; LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

1.4 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas compostas por duas membranas, uma interna e outra externa, que envolvem dois compartimentos, sendo eles o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial (WESTERMANN, 2012). Margulis e colaboradores (1967) propuseram a teoria endossimbiótica das organelas, onde a mitocôndria teria se originado de uma endossimbiose de uma α -protobactéria, um ancestral das células eucarióticas, ocorrido a cerca de 1,5 bilhão de anos. Essa organela de origem bacteriana foi tolerada pela imunidade e está presente no citoplasma das células dos eucariotos, atuando como reguladora central em inúmeras funções celulares (ARCHIBALD, 2015). Assim, as mitocôndrias participam de vários processos celulares, entre eles metabolismo, interação com outras organelas celulares, vias de

sinalização e síntese de ATP (adenosina 5'-trifosfato) (HATEFI, 1985; RUNKEL et al., 2014).

Grande parte dos eucariotos sintetiza ATP pela respiração aeróbica, pois é o método mais eficiente. A mitocôndria, através da fosforilação oxidativa, sintetiza aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células (HATEFI, 1985; GRAHL et al., 2012). Além de ser a principal fonte de energia celular, a mitocôndria também está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio (BERTERO; MAACK, 2018), captação de cálcio (VERCESI et al., 2018), apoptose e autofagia (HADJ-MOUSSA et al., 2018; FARMER et al., 2018), regulação de células imunológicas (MEYER et al., 2018), regulação metabólica sistêmica (MORROW et al., 2017), metabolismo da glicose e controle da sensibilidade à insulina em adipócitos (VERNOCHET et al., 2014; LEE et al., 2019), formação de cromatina citoplasmática e inflamação na senescência através da sinalização retrógrada (VIZIOLI et al., 2020), regulação da função de células-tronco neurais, além de apresentarem diferentes funções regulatórias de acordo com o tipo celular (como células pós-mitóticas e células cancerosas) (KHACHO et al., 2019).

A energia redox livre oriunda da oxidação dos aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, é convertida em ATP nas mitocôndrias (MITCHELL, 1961). O sistema que realiza a fosforilação oxidativa encontra-se na sua membrana interna. Em mamíferos, este sistema é composto por cinco complexos proteicos, sendo eles complexo I-IV (cadeia transportadora de elétrons) e o complexo V (F_0F_1 -ATP sintase). A cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons, localizada nas cristas mitocondriais, é constituída por quatro complexos proteicos, ubiquinona e citocromo c (BOYER et al., 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER et al., 1993; GUO et al., 2017).

Os elétrons removidos dos substratos oxidáveis, NADH e succinato, são inseridos na cadeia transportadora de elétrons através da ação de desidrogenases específicas, sendo elas a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I) e a succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II), respectivamente. Os complexos I e II transferem seus elétrons a ubiquinona (CoQ). Em seguida, os mesmos são transferidos sequencialmente para a ubiquinona:citocromo c oxidoredutase (complexo III), citocromo c, citocromo c-oxidase (complexo IV) e por fim ao oxigênio, formando água. Em relação aos elétrons oriundos da beta oxidação de ácidos graxos, esses são transferidos à cadeia transportadora de elétrons pela ubiquinona (BOYER et al., 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER et al., 1993; ZHAO et al., 2019).

Ao associar a hipótese quimiosmótica de Mitchell a hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, entende-se que um gradiente eletroquímico de H^+ é gerado pelo fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV. Isso porque este fluxo é acompanhado do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. O gradiente eletroquímico de H^+ é chamado de força próton motora (Δp), que é originada pelo gradiente químico (ΔpH) e pelo gradiente elétrico ($\Delta \Psi$). Assim, a energização das mitocôndrias com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons, cujo potencial elétrico de membrana é de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e a diferença de pH é de uma unidade (alcalino na matriz) (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1977; LEHNINGER et al., 1993).

Quando os íons H^+ retornam à matriz mitocondrial, uma energia é liberada induzindo a uma alteração na conformação do componente F_1 da F_0F_1 -ATP sintase, liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos. Essa energia livre também pode ser consumida por proteínas desacopladoras (UCPs). Em mamíferos, o fluxo de elétrons pelo complexo I é acompanhado pelo bombeamento de quatro prótons, já o fluxo pelo complexo III e IV é acompanhado pelo bombeamento de quatro e dois prótons, respectivamente (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1977; JONCKHEERE et al., 2012; ZHAO et al., 2019).

1.5 Componentes da cadeia transportadora de elétrons

A cadeia transportadora de elétrons possui componentes clássicos, sendo eles o complexo I, complexo II, ubiquinona, complexo III, citocromo c e complexo IV. Entretanto, fungos, plantas e alguns protozoários apresentam, além de alguns componentes clássicos, componentes alternativos, sendo eles NADH desidrogenases alternativas (NDH), proteínas desacopladoras (UCP), e oxidases alternativas (AOX) (ROSENFELD; BEAUVOIT, 2003; MARTINS et al., 2011- a).

Na cadeia transportadora de elétrons, as NDH catalisam a mesma reação redox que o complexo I. Entretanto, essas enzimas não realizam o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana, além de serem insensíveis à rotenona (inibidor do complexo I), mas sensíveis às flavonas (KERSCHER, 2000). É possível encontrar NDH na maioria dos protozoários e fungos, como por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae* (SMALL; MCALISTER-HENN, 1998), *Neurospora crassa* (CARNEIRO et al., 2007) e *A. fumigatus* (TUDELLA et al., 2004). A cadeia transportadora de elétrons da *S. cerevisiae*, por exemplo, não possui complexo I, mas contém três NDH insensíveis a rotenona. Dessas três, duas são NADH desidrogenases alternativas externas (Nde1 e Nde2) voltadas para o espaço intermembrana, e uma NADH

desidrogenase alternativa interna (Ndi1) voltada para a matriz mitocondrial (KERSCHER, 2000; MARTINS et al., 2011- a). Assim, a NDH é um possível alvo para novos agentes antifúngicos, uma vez que não está presente em mitocôndrias de mamíferos (LIN et al., 2008).

As AOXs por sua vez são enzimas oxidases alternativas resistentes a cianeto. Elas estão presentes nas mitocôndrias de muitos organismos, incluindo alguns fungos (como o *A. fumigatus* e ausente em *S. cerevisiae*), algas, todas as plantas, e alguns protozoários. A atividade das AOXs pode ser inibida pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Essas enzimas oferecem uma via alternativa de transporte de elétrons, transferindo-os da ubiquinona direto para o oxigênio. Dessa forma, não há transferência de elétrons pelos complexos III e IV, nem o bombeamento de prótons, ocorrendo uma diminuição na produção de ATP. O papel fisiológico das AOXs está relacionado com a resposta celular a altas temperaturas, escassez de nutrientes e produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, essas enzimas possuem um importante papel na manutenção da homeostase redox intracelular e na prevenção do estresse oxidativo (JOSEPH-HORNE et al., 2001; MAGNANI et al., 2008; MARTINS et al., 2011-b; ROGOV; ZVYAGILSKAYA, 2015; LUÉVANO-MARTÍNEZ et al., 2019). Portanto, AOXs também podem ser um alvo atraente para agentes antifúngicos, devido sua ausência em mamíferos e sua presença em patógenos fúngicos, como o *A. fumigatus*, onde desempenham funções importantes na defesa contra o dano celular (MARTINS et al., 2011- a).

Em relação às UCPs, são proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna, e fazem parte da família de transportadores mitocondriais. Estas proteínas realizam o transporte de prótons pela membrana mitocondrial interna, assim, os prótons retornam a matriz sem passar pelo complexo V. Dessa maneira, o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons é dissipado na forma de calor. As UCPs podem ser encontradas em mitocôndrias de plantas, protozoários, fungos, no tecido adiposo marrom e em alguns tecidos não-termogênicos de mamíferos (JARMUSZKIEWICZ et al., 2010; MARTINS et al., 2011- a). Entretanto, apesar dessas proteínas estarem amplamente distribuídas em organismos eucariotos, o que inclui o *A. fumigatus*, elas não estão presentes em *S. cerevisiae* (EL MOUALIJ et al., 1997; JARMUSZKIEWICZ et al., 2010). As UCPs são inibidas por nucleotídeos de purina, e ativadas por ácidos graxos livres (JARMUSZKIEWICZ et al., 2010; MARTINS et al., 2011- a).

1.6 Complexos TOM/TIM

A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear. Após a síntese dessas proteínas no citosol, elas são endereçadas para as mitocôndrias e transportadas por um sistema de importação (ENDO; YAMANO, 2009; WIEDEMANN; PFANNER, 2017). Em *S. cerevisiae*, por exemplo, apenas oito proteínas principais são sintetizadas nas mitocôndrias, sendo elas uma proteína ribossomal da pequena subunidade (Var1), e subunidades dos complexos respiratórios III (Cytb), IV (Cox1, Cox2, Cox3) e V (Atp6, Atp8 e Atp9) (MALINA et al., 2018).

Algumas proteínas mitocondriais sintetizadas no citosol são endereçadas as mitocôndrias por possuírem sequências sinalizadoras internas. Enquanto outras possuem uma pré-sequência (referido também como peptídeo sinal), sendo uma extensão clivável na extremidade N-terminal que sinaliza o seu endereçamento para as mitocôndrias (PALMIERI; PIERRI, 2010; FERRAMOSCA; ZARA, 2013; KULAWIAK et al., 2013). Assim, cerca de 99% destas proteínas são sintetizadas como pré-proteínas (também chamadas de precursores), e dependem de complexos proteicos específicos para serem endereçadas e modificadas para sua forma nativa (ENDO; YAMANO, 2009; ARAISO et al., 2019). Aproximadamente 60% destas pré-proteínas mitocondriais são sintetizadas contendo pré-sequências cliváveis. Quando presente, geralmente a pré-sequência é composta de 15-80 aminoácidos (VÖGTLE et al., 2009; MALINA et al., 2018).

A mitocôndria possui duas membranas biológicas com diferentes composições proteicas e lipídicas: a membrana mitocondrial externa e a membrana mitocondrial interna. A membrana mitocondrial externa é praticamente permeável a todas as moléculas e íons e a membrana mitocondrial interna é praticamente impermeável, sendo que a principal forma de entrada de substratos para a matriz mitocondrial ocorre por transportadores mitocondriais. Dessa forma, cada membrana possui um complexo proteico específico para reconhecimento e endereçamento das proteínas mitocondriais sintetizadas no citosol (BOHNERT et al., 2007).

O complexo denominado TOM (translocase de membrana mitocondrial externa) está inserido na membrana mitocondrial externa e realiza o endereçamento de proteínas do citosol para o espaço intermembranas ou para a membrana mitocondrial externa. Assim, aquelas cujo destino é algum compartimento mitocondrial interno, precisam atravessar a membrana externa através do complexo TOM. Os complexos TIM (translocase de membrana mitocondrial interna) estão inseridos na membrana mitocondrial interna e realizam o endereçamento de proteínas do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial ou para a própria membrana

mitocondrial interna (RASSOW et al., 1999; BOHNERT et al., 2007, ELLENRIEDER et al., 2019).

Em leveduras e mamíferos, o complexo TOM é formado por sete proteínas transmembranares. As proteínas Tom40, Tom5, Tom6 e Tom7 correspondem ao núcleo do complexo, onde é formado um poro que realiza o transporte de cadeias polipeptídicas não dobradas pela membrana externa. Tom20, Tom70 e Tom22 são receptores de proteínas que reconhecem precursores proteicos destinados à mitocôndria. A proteína Tom20 geralmente realiza o reconhecimento de pré-proteínas que possuem pré-sequência na extremidade N-terminal, enquanto Tom70 geralmente realiza o reconhecimento de pré-proteínas que contêm informações de direcionamento interno. Entretanto, a proteína Tom22 também colabora com a movimentação de pré-proteínas no poro de translocação. Além disso, o complexo TOM pode interagir com os complexos TIM, permitindo a transferência de pré-proteínas da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna (KÜNKELE et al., 1998; GEBERT et al., 2012; SHIOTA et al., 2015).

Entretanto, em *S. cerevisiae* e *N. crassa* a proteína Tom20 não reconhece apenas os precursores contendo uma pré-sequência clivável em sua extremidade N-terminal, mas reconhecem também alguns precursores contendo sinais de direcionamento interno. Alguns exemplos disso são o transportador de fosfato e o translocador de ADP/ATP que, embora sejam reconhecidos em sua maioria pela proteína Tom70, quando a proteína Tom20 está ausente, a importação desses precursores é reduzida em cerca de 25%. Além disso, nem todos os precursores com sinal de direcionamento interno utilizam Tom70 como receptor principal, como é o caso da proteína porina de *S. cerevisiae*, que utiliza como receptor principal a proteína Tom20 (MOCZKO et al., 1994; PFANNER, 1998; BRIX et al., 1999; KOEHLER et al., 1999; MUTO et al., 2001; AVENDAÑO-MONSALVE et al., 2020).

O TIM por sua vez possui dois complexos sendo eles TIM22, que transloca os precursores de proteínas de membrana interna que não possuem pré-sequência no N-terminal, e TIM23, que transloca os precursores que contêm uma pré-sequência clivável na extremidade N-terminal (CHACINSKA et al., 2005). O complexo TIM23 possui cinco subunidades TIM17, TIM50, TIM23, TIM21 e Mgr2, que são essenciais para a formação de um canal condutor de proteínas, ativado pelo $\Delta\Psi$. Assim, a translocação das pré-proteínas pelo complexo TIM23 é conduzida pelo $\Delta\Psi$ da membrana mitocondrial interna (MARTIN et al., 1991; MALINA et al., 2018).

Durante a translocação pelo complexo TOM, em *S. cerevisiae*, as pré-proteínas contendo sinal de direcionamento interno (proteínas hidrofóbicas) e aquelas contendo uma

pré-sequência, geralmente percorrem caminhos de translocação diferentes, interagindo com diferentes resíduos. Àqueles precursores sem a pré-sequência deixam o canal interagindo com as subunidades Tom5 e Tom40, e posteriormente com as chaperonas TIM e Mia40 que são recrutadas para que essas proteínas sejam transportadas eficientemente. Entretanto, àquelas contendo pré-sequência interagem com as subunidades Tom22, Tom7 e Tom40 sendo, a seguir, transferidas para a subunidade Tim50 e Tim23 do complexo TIM23. Dessa forma, o complexo TOM realiza uma classificação intramitocondrial das pré-proteínas (ARAISSO et al., 2019).

Assim, após as pré-proteínas contendo pré-sequência serem reconhecidas pela subunidade Tom20 do complexo TOM e serem translocadas para o interior das mitocôndrias, as mesmas são direcionadas para o complexo TIM23. Posteriormente, peptidases de processamento mitocondrial clivam a sua pré-sequência, e as proteínas são finalmente direcionadas para o seu local de inserção. Essa via é chamada de via TIM23 ou via da pré-sequência (CALLEGARI et al., 2020).

No complexo TIM23, a proteína Tim23 constitui um receptor de pré-sequência, enquanto Tim17 constitui um canal que conduz as proteínas através da membrana interna. A proteína Tim44 auxilia na saída dessa proteína do canal, recrutando a proteína Hsp70 e a chaperona Mge1p, que realizam a translocação utilizando ATP. Ademais, algumas proteínas da família de transportadores possuem sequência de direcionamento interno e por isso são reconhecidas pelo receptor Tom70. Para inserir esses transportadores na membrana interna, após a translocação pelo complexo TOM, ocorre uma interação dos transportadores com as proteínas Tim9, Tim10 e Tim12. A seguir, as proteínas Tim8 e Tim13 interagem com Tim9 auxiliando na importação dessas pré-proteínas. Tim54 juntamente com Tim22, utilizando o $\Delta\Psi$, realizam a inserção das proteínas transportadoras na membrana interna. A exportação de precursores da matriz para a membrana interna é realizada pelo complexo OXA1 (Figura 1) (BAUER et al., 2000).

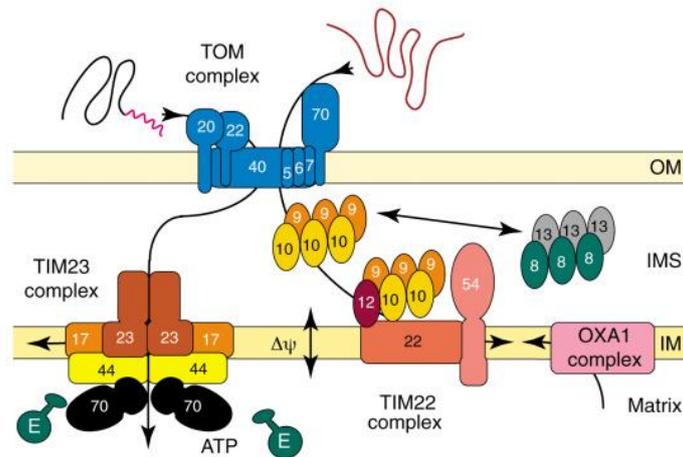


Figura 1: Organização geral dos complexos TOM e TIM na membrana mitocondrial externa (OM) e membrana interna (IM). Abreviaturas: OM, membrana externa; IM, membrana interna; IMS, espaço intermembrana; 70, Hsp70; E, Mge1p. Adaptado de Bauer e colaboradores (2000).

Em *S. cerevisiae* alterações no complexo TOM, como a deleção ou fosforilação de algumas subunidades deste complexo, podem acarretar um fenótipo de redução de crescimento e uma diminuição na importação de proteínas mitocondriais, tais como: translocador de ADP/ATP, F1ATP sintetase subunidade- β , citocromo b2 (HINES et al., 1990; RASSOW et al., 1999; GRAD et al., 1999; RAO et al., 2012).

Após a identificação da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 em *S. cerevisiae* e *N. crassa* foi observado que esta, juntamente com a translocase Tom22, realiza a translocação de pré-proteínas para a matriz e de proteínas destinadas à inserção na membrana externa. Assim, Tom22 auxilia Tom20 a guiar as pré-proteínas até a subunidade Tom40 do complexo (RAMAGE et al., 1993; MAYER et al., 1995; BRIX et al., 1997; BAUSEWEIN et al., 2017). Dessa forma, além de reconhecer o sinal de direcionamento dos precursores, a proteína Tom20 também é responsável por facilitar a ancoragem eficiente desses precursores ao núcleo do complexo TOM, aumentando a eficiência da importação (YAMAMOTO et al., 2011).

A maior parte dos estudos envolvendo a via da pré-sequência foram realizados em leveduras. Porém, apesar da maquinaria principal das mitocôndrias ser conservada entre os eucariotos, conforme são realizados estudos sobre essa via em humanos, fica evidente que existem diferenças funcionais entre elas (ARAISSO et al., 2019; CALLEGARI et al., 2020).

De acordo com Firon e colaboradores (2003) existe homologia entre algumas proteínas de *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, indicando uma provável função semelhante entre elas. Entretanto, diversos genes que codificam componentes mitocondriais essenciais foram identificados em *Aspergillus* e não foram identificados em *S. cerevisiae*. Sendo assim, apesar

da homologia, algumas proteínas podem ter funções celulares diferentes, e alguns genes que não são essenciais em leveduras podem ser essenciais em *A. fumigatus*.

1.7 Expressão Heteróloga

Para expressar proteínas recombinantes, são utilizados sistemas hospedeiros de expressão heteróloga. Os sistemas utilizados são geralmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BANEYX, 1999; CREGG et al., 2000; MALYS et al., 2011; VISSER, 2011). Essa tecnologia pode ser utilizada para clonagem e posterior expressão do gene de interesse. Assim, de acordo com a finalidade, seleciona-se o sistema hospedeiro mais adequado. (BALAMURUGAN et al., 2006).

Apesar dos procariotos serem capazes de expressar qualquer gene, alguns componentes bacterianos tóxicos podem afetar o produto. Além disso, algumas vezes as proteínas produzidas não possuem a estabilidade biológica ou a atividade esperada. Sendo assim, um sistema alternativo à expressão de proteínas por hospedeiros procariotos são as células eucarióticas. Os eucariotos possuem diversas características genéticas, moleculares e bioquímicas em comum entre si, e isso contribui para que a proteína natural seja semelhante à proteína recombinante obtida em todas as suas propriedades (GOMES et al., 2016).

Entre os sistemas de expressão, os que possuem o maior valor comercial são as leveduras, sendo mais utilizada a *S. cerevisiae*. Esta levedura possui alguns aspectos bem caracterizados como sua biologia celular, bioquímica e genética, sendo considerado um organismo modelo para pesquisar funções celulares (GLICK et al., 2010).

As leveduras associam algumas vantagens do sistema de expressão procariota e do eucariota. As vantagens que elas possuem em comum com os sistemas procariotas envolve o rápido crescimento, alto nível de expressão, meio de cultura barato, fácil expansão, crescimento e manutenção. Entre as vantagens em comum aos sistemas eucariotas, está a de serem capazes de realizar a maior parte das modificações pós-traducionais, como por exemplo, realizar o dobramento e o processamento de proteínas (BALAMURUGAN et al., 2006; DALY; HEARN, 2005; MATTANOVICH et al., 2012). Além disso, este sistema produz e secreta as proteínas intactas no meio e realiza a integração das mesmas no local específico (BALAMURUGAN et al., 2006; MATTANOVICH et al., 2012). Por isso, *S. cerevisiae* é utilizada com frequência para expressar diversas proteínas (GLICK et al., 2010; MATTANOVICH et al., 2012).

A transformação das células hospedeiras é realizada geralmente utilizando vetores híbridos, contendo sequências provenientes de leveduras e bactérias. A região proveniente de leveduras possui sequências que promovem a seleção de leveduras transformadas, como o gene para oritidina 5'-descarboxilase (URA3). A região procariótica, por sua vez, contém uma sequência que promove resistência específica a um antibiótico e uma origem de replicação, garantindo, respectivamente, a seleção e a propagação em uma bactéria hospedeira (HINNEN et al., 1994).

Além da expressão heteróloga, outro método para estudar a função de um gene é a deleção deste e posterior análise dos mutantes que não o possuem (SMITH et al., 1995). Este método foi adotado anteriormente, sendo considerada a nossa primeira estratégia para estudar a função do gene *tom20* (AFUA_6G11380) em mitocôndrias de *A. fumigatus*. Porém, após a construção do cassete de deleção e inúmeras transformações, nenhuma das colônias obtidas o gene em questão havia sido deletado. Este gene possivelmente é essencial para o *A. fumigatus* como ocorre em *S. cerevisiae* (ZHANG; REN, 2015) e, por isso, os isolados viáveis não continham a mutação. Um método alternativo para estudar a função dos genes é através da expressão heteróloga em organismos que apresentam a deleção parcial do gene.

2. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- A sequência de cDNA do gene *Aftom20* possui 510 nucleotídeos e, quando clonado em vetor pYES2/CT, codifica uma proteína de 211 aminoácidos.
- A expressão da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* não influencia no crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* em meio fermentável.
- A proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* possui função importante para a atividade mitocondrial, podendo ser responsável pelo reconhecimento de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase.

3. REFERÊNCIAS

ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol**, 27, n. 4, p. 155-182, 2010 Oct-Dec 2010.

AGARWAL, R.; AGGARWAL, A. N.; GARG, M.; SAIKIA, B. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis with aspergilloma: an immunologically severe disease with poor outcome. **Mycopathologia**, 174, n. 3, p. 193-201, Sep 2012.

AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma: epidemiological, clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, 8, n. 11, p. 1463-1474, Nov 2013.

AGARWAL, R.; HAZARIKA, B.; GUPTA, D.; AGGARWAL, A. N. *et al.* *Aspergillus* hypersensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: COPD as a risk factor for ABPA? **Med Mycol**, 48, n. 7, p. 988-994, Nov 2010.

AHTING, U.; WAIZENEGGER, T.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. **J Biol Chem**, 280, n. 1, p. 48-53, Jan 07 2005.

AKERMAN, K. E.; WIKSTRÖM, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, 68, n. 2, p. 191-197, Oct 1976.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nat Biotechnol**, 37, n. 4, p. 420-423, 04 2019.

ARAIKO, Y.; TSUTSUMI, A.; QIU, J.; IMAI, K. *et al.* Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. **Nature**, 575, n. 7782, p. 395-401, 11 2019.

ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; HOUBRAKEN, J.; LOMBARDI, L. *et al.* and aspergillosis: From basics to clinics. **Stud Mycol**, 100, p. 100115, Sep 2021.

ARCHIBALD, J. M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. **Curr Biol**, 25, n. 19, p. 911-921, Oct 2015.

ASHU, E. E.; KORFANTY, G. A.; SAMARASINGHE, H.; PUM, N. *et al.* Widespread amphotericin B-resistant strains of. **Infect Drug Resist**, 11, p. 1549-1555, 2018.

AVENDAÑO-MONSALVE, M. C.; PONCE-ROJAS, J. C.; FUNES, S. From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey. **Biol Chem**, 401, n. 6-7, p. 645-661, 05 2020.

BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; SINGH, R. K. **Biotechnology in the Production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health. Journal of Animal and Veterinary Advances**, 5, n. 6, p. 487-495, 2006.

- BALICO, L. L. L.; DE SOUZA SANTOS, E.; SUZUKI-HATANO, S.; SOUSA, L. O. *et al.* Heterologous expression of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter (Ndt1) from *Aspergillus fumigatus* rescues impaired growth in Δ ndt1 Δ ndt2 *Saccharomyces cerevisiae* strain. **J Bioenerg Biomembr**, 49, n. 6, p. 423-435, Dec 2017.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 10, n. 5, p. 411-421, Oct 1999.
- BAUER, M. F.; HOFMANN, S.; NEUPERT, W.; BRUNNER, M. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. **Trends Cell Biol**, 10, n. 1, p. 25-31, Jan 2000.
- BAUSEWEIN, T.; MILLS, D. J.; LANGER, J. D.; NITSCHKE, B. *et al.* Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. **Cell**, 170, n. 4, p. 693-700.e697, Aug 2017.
- BERTERO, E.; MAACK, C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. **Circ Res**. 122: 1460 - 1478 p. 2018.
- BLAIZE, M.; MAYAUX, J.; NABET, C.; LAMPROS, A. *et al.* Fatal Invasive Aspergillosis and Coronavirus Disease in an Immunocompetent Patient. **Emerg Infect Dis**, 26, n. 7, p. 1636-1637, 07 2020.
- BODEY, G. P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 8, n. 5, p. 413 - 437, 1989.
- BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. **FEBS Lett**, 581, n. 15, p. 2802-2810, Jun 2007.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 28, n. 3, p. 495-503, Mar 1990.
- BOYER, P. D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; MITCHELL, P. *et al.* Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Annu Rev Biochem**, 46, p. 955-966, 1977.
- BRAKHAGE, A. A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annu Rev Microbiol**, 56, p. 433-455, 2002.
- BRIX, J.; DIETMEIER, K.; PFANNER, N. Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. **J Biol Chem**, 272, n. 33, p. 20730-20735, Aug 1997.
- BRIX, J.; RÜDIGER, S.; BUKAU, B.; SCHNEIDER-MERGENER, J. *et al.* Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. **J Biol Chem**, 274, n. 23, p. 16522-16530, Jun 1999.
- CALLEGARI, S.; CRUZ-ZARAGOZA, L. D.; REHLING, P. From TOM to the TIM23 complex - handing over of a precursor. **Biol Chem**, 401, n. 6-7, p. 709-721, 05 2020.

- CARNEIRO, P.; DUARTE, M.; VIDEIRA, A. The external alternative NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*. **J Mol Biol**, 368, n. 4, p. 1114-1121, May 2007.
- CERVENY, L.; STRASKOVA, A.; DANKOVA, V.; HARTLOVA, A. *et al.* Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. **Infect Immun**, 81, n. 3, p. 629-635, Mar 2013.
- CHACINSKA, A.; KOEHLER, C. M.; MILENKOVIC, D.; LITHGOW, T. *et al.* Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. **Cell**, 138, n. 4, p. 628-644, Aug 21 2009.
- CHACINSKA, A.; LIND, M.; FRAZIER, A. E.; DUDEK, J. *et al.* Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. **Cell**, 120, n. 6, p. 817-829, Mar 2005.
- CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**, 18, n. 24, p. 5294-5299, Nov 1979.
- CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; XU, J.; MEIS, J. F. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS Pathog**, 9, n. 10, p. e1003633, Oct 2013
- CONSORTIUM, U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Res**, 49, n. D1, p. D480-D489, 01 2021.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol**, 16, n. 1, p. 23-52, Sep 2000.
- D'ANDREA, L. D.; REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends Biochem Sci**, 28, n. 12, p. 655-662, Dec 2003
- DAGENAIS, T. R.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 3, p. 447-465, Jul 2009.
- DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, 18, n. 2, p. 119-138, 2005 Mar-Apr 2005.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clin Infect Dis**, 26, n. 4, p. 781-803, Apr 1998.
- DOLGOVA, A. S.; STUKOLOVA, O. A. High-fidelity PCR enzyme with DNA-binding domain facilitates de novo gene synthesis. **3 Biotech**, 7, n. 2, p. 128, Jun 2017.
- ELLENRIEDER, L.; DIETERLE, M. P.; DOAN, K. N.; MÅRTENSSON, C. U. *et al.* Dual Role of Mitochondrial Porin in Metabolite Transport across the Outer Membrane and Protein Transfer to the Inner Membrane. **Mol Cell**, 73, n. 5, p. 1056-1065, Feb 2019.

- EL MOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; SLUSE, F. E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 13, n. 6, p. 573-581, May 1997.
- ENDO, T.; YAMANO, K. Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. **Biol Chem**, 390, n. 8, p. 723-730, Aug 2009.
- FARMER, T.; NASLAVSKY, N.; CAPLAN, S. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. **Traffic**, 19, n. 8, p. 569-577, Aug 2018.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: molecular mechanisms of import into mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, 1833, n. 3, p. 494-502, Mar 2013.
- FIRON, A.; VILLALBA, F.; BEFFA, R.; D'ENFERT, C. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryot Cell**, 2, n. 2, p. 247-255, Apr 2003.
- GARCIA-RUBIO, R.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. **Drugs**, 77, n. 6, p. 599-613, Apr 2017.
- GARRIGUES, J. C.; CADET DE FONTENAY, G.; LINAS, M. D.; LAGENTE, M. *et al.* New in vitro assay based on glucose consumption for determining intraconazole and amphotericin B activities against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, 38, n. 12, p. 2857-2862, Dec 1994.
- GEBERT, M.; SCHREMPP, S. G.; MEHNERT, C. S.; HEIßWOLF, A. K. *et al.* Mgr2 promotes coupling of the mitochondrial presequence translocase to partner complexes. **J Cell Biol**, 197, n. 5, p. 595-604, May 2012.
- GIETZ, D.; ST JEAN, A.; WOODS, R. A.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Res**, 20, n. 6, p. 1425, Mar 1992.
- GINIGER, E.; VARNUM, S. M.; PTASHNE, M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Cell**, 40, n. 4, p. 767-774, Apr 1985.
- GLAB, N.; WISE, R. P.; PRING, D. R.; JACQ, C. *et al.* Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. **Mol Gen Genet**, 223, n. 1, p. 24-32, Aug 1990.
- GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J.; PATTEN, C. L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. **American Society for Microbiology**, Washington, 2010.
- GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

- GRAD, L. I.; DESCHENEAU, A. T.; NEUPERT, W.; LILL, R. *et al.* Inactivation of the *Neurospora crassa* mitochondrial outer membrane protein TOM70 by repeat-induced point mutation (RIP) causes defects in mitochondrial protein import and morphology. **Curr Genet**, 36, n. 3, p. 137-146, Sep 1999.
- GRAHL, N.; DINAMARCO, T. M.; WILLGER, S. D.; GOLDMAN, G. H. *et al.* *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Mol Microbiol**, 84, n. 2, p. 383-399, Apr 2012.
- GUO, R.; ZONG, S.; WU, M.; GU, J. *et al.* Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I. **Cell**, 170, n. 6, p. 1247-1257, Sep 2017.
- HABIB, S. J.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. **Methods Cell Biol**, 80, p. 761-781, 2007.
- HADJ-MOUSSA, H.; GREEN, S. R.; STOREY, K. B. The Living Dead: Mitochondria and Metabolic Arrest. **IUBMB Life**, 70, n. 12, p. 1260-1266, Dec 2018.
- HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw? **Biocycle**, v.36, n.4, p.32-35, 1995.
- HAGIWARA, D.; SAKAI, K.; SUZUKI, S.; UMEMURA, M. *et al.* Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, 12, n. 5, p. 1-20, 2017.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, 166, n. 4, p. 557-580, Jun 05 1983.
- HARKNESS, T. A.; NARGANG, F. E.; VAN DER KLEI, I.; NEUPERT, W. *et al.* A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. **J Cell Biol**, 124, n. 5, p. 637-648, Mar 1994.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu Rev Biochem**, 54, p. 1015-1069, 1985.
- HAUCKE, V.; HORST, M.; SCHATZ, G.; LITHGOW, T. The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. **EMBO J**, 15, n. 6, p. 1231-1237, Mar 15 1996.
- HELLEBERG, M.; STEENSEN, M.; ARENDRUP, M. C. Invasive aspergillosis in patients with severe COVID-19 pneumonia. **Clin Microbiol Infect**, 27, n. 1, p. 147-148, 01 2021.
- HINES, V.; BRANDT, A.; GRIFFITHS, G.; HORSTMANN, H. *et al.* Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. **EMBO J**, 9, n. 10, p. 3191-3200, Oct 1990.
- HINNEN, A., BUXTON, F., CHAUDHURI, B., HEIM, J., HOTTIGER, T., MEYHACK, B. AND POHLIG, G. Gene expression in recombinant yeast. In: Smith, A. (Ed.), **Gene**

Expression in Recombinant Microorganisms. Marcel Dekker, New York, NY, p. 121-193, 1994.

HOGABOAM, C. M.; CARPENTER, K. J.; SCHUH, J. M.; BUCKLAND, K. F. *Aspergillus* and asthma--any link? **Med Mycol**, 43 Suppl 1, p. 197-202, May 2005.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryot Cell**, 6, n. 11, p. 1953-1963, Nov 2007.

HOUTS, G. E.; MIYAGI, M.; ELLIS, C.; BEARD, D. *et al.* Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. **J Virol**, 29, n. 2, p. 517-522, Feb 1979.

HUA, X.; LIU, W.; SU, Y.; LIU, X. *et al.* Studies on the novel pyridine sulfide containing SDH based heterocyclic amide fungicide. **Pest Manag Sci**, 76, n. 7, p. 2368-2378, Jul 2020.

HUANG, D.; LI, B.; CHU, H.; ZHANG, Z. *et al.* Endobronchial aspergilloma: A case report and literature review. **Exp Ther Med**, 14, n. 1, p. 547-554, Jul 2017.

ITO, J. I.; LYONS, J. M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **J Infect Dis**, 186, n. 6, p. 869-871, Sep 2002.

IWAHASHI, J.; YAMAZAKI, S.; KOMIYA, T.; NOMURA, N. *et al.* Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. **J Biol Chem**, 272, n. 29, p. 18467-18472, Jul 18 1997.

JARMUSZKIEWICZ, W.; WOYDA-PLOSZCZYCA, A.; ANTOS-KRZEMINSKA, N.; SLUSE, F. E. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochim Biophys Acta**, 1797, n. 6-7, p. 792-799, 2010 Jun-Jul 2010.

JEANVOINE, A.; ROCCHI, S.; BELLANGER, A. P.; REBOUX, G. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment? **Med Mal Infect**, 50, n. 5, p. 389-395, Aug 2020.

JONCKHEERE, A. I.; SMEITINK, J. A.; RODENBURG, R. J. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **J Inherit Metab Dis**, 35, n. 2, p. 211-225, Mar 2012.

JORES, T.; KLINGER, A.; GROß, L. E.; KAWANO, S. *et al.* Characterization of the targeting signal in mitochondrial β -barrel proteins. **Nat Commun**, 7, p. 12036, 06 2016.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W.; WOOD, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochim Biophys Acta**, 1504, n. 2-3, p. 179-195, Apr 2001.

JUN, Y. W.; PARK, H.; LEE, Y. K.; KAANG, B. K. *et al.* D-AKAP1a is a signal-anchored protein in the mitochondrial outer membrane. **FEBS Lett**, 590, n. 7, p. 954-961, Apr 2016.

KANAJI, S.; IWAHASHI, J.; KIDA, Y.; SAKAGUCHI, M. *et al.* Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. **J Cell Biol**, 151, n. 2, p. 277-288, Oct 16 2000.

- KERSCHER, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochim Biophys Acta**, 1459, n. 2-3, p. 274-283, Aug 2000.
- KHACHO, M.; HARRIS, R.; SLACK, R. S. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. **Nat Rev Neurosci**, 20, n. 1, p. 34-48, 01 2019.
- KIZHAKEDATHIL, M. P. J., KOPPULA, A. R., SUBATHRA, D. C. A brief review on invasive aspergillosis and the host immune response and the target drugs. **Immunol., Endocr. Metab. Agents Med. Chem.**, 17, n. 1, p. 4-14, 2017
- KOEHLER, C. M.; MERCHANT, S.; SCHATZ, G. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. **Trends Biochem Sci**, 24, n. 11, p. 428-432, Nov 1999.
- KOEHLER, P.; CORNELLY, O. A.; BÖTTIGER, B. W.; DUSSE, F. *et al.* COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, 63, n. 6, p. 528-534, Jun 2020.
- KOEHLER, P.; TACKE, D.; CORNELLY, O. A. Aspergillosis of bones and joints - a review from 2002 until today. **Mycoses**, 57, n. 6, p. 323-335, Jun 2014.
- KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. Republished: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Postgrad Med J**, 91, n. 1077, p. 403-410, Jul 2015.
- KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, 44, n. 2, p. 283-292, Jan 1986.
- KRADIN, R. L.; MARK, E. J. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. **Arch Pathol Lab Med**, 132, n. 4, p. 606-614, Apr 2008.
- KULAWIAK, B.; HÖPKER, J.; GEBERT, M.; GUIARD, B. *et al.* The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. **Biochim Biophys Acta**, 1827, n. 5, p. 612-626, May 2013.
- KÜNKELE, K. P.; HEINS, S.; DEMBOWSKI, M.; NARGANG, F. E. *et al.* The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. **Cell**, 93, n. 6, p. 1009-1019, Jun 1998.
- KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? **PLoS Pathog**, 9, n. 12, p. 1-4, 2013.
- LAMB, J. R.; TUGENDREICH, S.; HIETER, P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? **Trends Biochem Sci**, 20, n. 7, p. 257-259, Jul 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.
- LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Front Microbiol**, 7, p. 683, 2016.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, 12, n. 2, p. 310-350, Apr 1999.

LATGÉ, J. P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Curr Opin Microbiol**, 5, n. 4, p. 355-358, Aug 2002.

LATGÉ, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clin Microbiol Rev**, 33, n. 1, p. 1-75, Dec 2019.

LEE, J. H.; PARK, A.; OH, K. J.; LEE, S. C. *et al.* The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**, 20, n. 19, Oct 04 2019.

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

LEMIRE, B. D.; OYEDOTUN, K. S. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. **Biochim Biophys Acta**, 1553, n. 1-2, p. 102-116, Jan 17 2002.

LICATALOSI, D. D.; DARNELL, R. B. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. **Nat Rev Genet**, 11, n. 1, p. 75-87, Jan 2010.

LIN, S. S.; KERSCHER, S.; SALEH, A.; BRANDT, U. *et al.* The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase TgNDH2-I is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. **Biochim Biophys Acta**, 1777, n. 11, p. 1455-1462, Nov 2008.

LINDNER, P.; BAUER, K.; KREBBER, A.; NIEBA, L. *et al.* Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. **Biotechniques**, 22, n. 1, p. 140-149, Jan 1997.

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**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K. *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res**, 48, n. D1, p. D265-D268, 01 2020.

LUÉVANO-MARTÍNEZ, L. A.; CALDEIRA DA SILVA, C. C.; NICASTRO, G. G.; SCHUMACHER, R. I. *et al.* Mitochondrial alternative oxidase is determinant for growth and sporulation in the early diverging fungus *Blastocladiella emersonii*. **Fungal Biol**, 123, n. 1, p. 59-65, 01 2019.

MAGNANI, T.; SORIANI, F. M.; MARTINS, V. E. P.; POLICARPO, A. C. *et al.* Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. **J Bioenerg Biomembr**, 40, n. 6, p. 631-636, Dec 2008.

MALAVAZI, I. & GOLDMAN, G.H. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. **Methods in Molecular Biology**, 845, p. 99-118, 2012.

- MALINA, C.; LARSSON, C.; NIELSEN, J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. **FEMS Yeast Res**, 18, n. 5, 08 2018.
- MALYS, N.; WISHART, J. A.; OLIVER, S. G.; MCCARTHY, J. E. Protein production in *Saccharomyces cerevisiae* for systems biology studies. **Methods Enzymol**, 500, p. 197-212, 2011.
- MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nat Biotechnol**, 21, n. 3, p. 255-261, Mar 2003.
- MARGULIS, L. On the Origin of Mitosing Cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 14, p. 225-274, 1967.
- MARKO, M. A.; CHIPPERFIELD, R.; BIRNBOIM, H. C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. **Anal Biochem**, 121, n. 2, p. 382-387, Apr 1982.
- MARTIN, J.; MAHLKE, K.; PFANNER, N. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. **J Biol Chem**, 266, n. 27, p. 18051-18057, Sep 1991.
- MARTINS, V. E. P.; DINAMARCO, T. M.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. **J Bioenerg Biomembr**, 43, n. 1, p. 81-88, Feb 2011-a.
- MARTINS, V. P.; DINAMARCO, T. M.; SORIANI, F. M.; TUDELLA, V. G. *et al.* Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryot Cell**, 10, n. 2, p. 237-248, Feb 2011-b.
- MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B. *et al.* Recombinant protein production in yeasts. **Methods Mol Biol**, 824, p. 329-358, 2012.
- MAYER, A.; NARGANG, F. E.; NEUPERT, W.; LILL, R. MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. **EMBO J**, 14, n. 17, p. 4204-4211, Sep 1995.
- MAYR, A.; LASS-FLÖRL, C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. **Eur J Med Res**, 16, n. 4, p. 153-157, Apr 2011.
- MCBRIDE, H. M.; MILLAR, D. G.; LI, J. M.; SHORE, G. C. A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. **J Cell Biol**, 119, n. 6, p. 1451-1457, Dec 1992.
- MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. **Cell Microbiol**, 12, n. 11, p. 1535-1543, Nov 2010.

MEYER, A.; LAVERNY, G.; BERNARDI, L.; CHARLES, A. L. *et al.* Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. **Front Immunol**, 9, p. 536, 2018.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. Aspergillus as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnol Lett**, 33, n. 3, p. 469-476, Mar 2011.

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

MOCZKO, M.; EHMANN, B.; GÄRTNER, F.; HÖNLINGER, A. *et al.* Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **J Biol Chem**, 269, n. 12, p. 9045-9051, Mar 1994.

MOORE, S. Pancreatic DNase, in: The Enzymes. **Academic Press**: Boyer, P., New York, p. 281, 1981.

MORETTI-ALMEIDA, G.; NETTO, L. E.; MONTEIRO, G. The essential gene YMR134W from *Saccharomyces cerevisiae* is important for appropriate mitochondrial iron utilization and the ergosterol biosynthetic pathway. **FEBS Lett**, 587, n. 18, p. 3008-3013, Sep 17 2013.

MORROW, R. M.; PICARD, M.; DERBENEVA, O.; LEIPZIG, J. *et al.* Mitochondrial energy deficiency leads to hyperproliferation of skeletal muscle mitochondria and enhanced insulin sensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 10, p. 2705-2710, 03 07 2017.

MUTO, T.; OBITA, T.; ABE, Y.; SHODAI, T. *et al.* NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. **J Mol Biol**, 306, n. 2, p. 137-143, Feb 2001.

NEUPERT, W. A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. **J Mol Biol**, 427, n. 6 Pt A, p. 1135-1158, Mar 27 2015.

NUGENT, T.; JONES, D. T. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. **BMC Bioinformatics**, 10, p. 159, May 26 2009.

PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Structure and function of mitochondrial carriers - role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. **FEBS Lett**, 584, n. 9, p. 1931-1939, May 2010.

PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; NAGY, G.; VIANELLO, A. *et al.* Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondria. **FEBS Lett**, 307, n. 3, p. 267-271, Aug 1992.

PFANNER, N. Mitochondrial import: crossing the aqueous intermembrane space. **Curr Biol**, 8, n. 8, p. R262-265, Apr 1998.

QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nat Protoc**, 6, n. 2, p. 242-251, Feb 2011.

RAMAGE, L.; JUNNE, T.; HAHNE, K.; LITHGOW, T. *et al.* Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. **EMBO J**, 12, n. 11, p. 4115-4123, Nov 1993.

- RAO, S.; SCHMIDT, O.; HARBAUER, A. B.; SCHÖNFISCH, B. *et al.* Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. **Mol Biol Cell**, 23, n. 9, p. 1618-1627, May 2012.
- RAPAPORT, D. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. **EMBO Rep**, 4, n. 10, p. 948-952, Oct 2003.
- RASSOW, J.; DEKKER, P. J.; VAN WILPE, S.; MEIJER, M. *et al.* The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. **J Mol Biol**, 286, n. 1, p. 105-120, Feb 1999.
- REDDY, A. S. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. **Annu Rev Plant Biol**, 58, p. 267-294, 2007.
- REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L.; MORETTI, M. L. *et al.* Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, 61, n. 6, p. 360-365, Jun 2018.
- RIMMER, K. A.; FOO, J. H.; NG, A.; PETRIE, E. J. *et al.* Recognition of mitochondrial targeting sequences by the import receptors Tom20 and Tom22. **J Mol Biol**, 405, n. 3, p. 804-818, Jan 21 2011.
- ROCCHI, S.; REBOUX, G.; MILLON, L. [Azole resistance with environmental origin: What alternatives for the future?]. **J Mycol Med**, 25, n. 4, p. 249-256, Dec 2015.
- ROGOV, A. G.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants). **Biochemistry (Mosc)**, 80, n. 4, p. 400-407, Apr 2015.
- ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 20, n. 13, p. 1115-1144, Oct 2003.
- RUF, D.; BRANTL, V.; WAGENER, J. Mitochondrial Fragmentation in. **Front Cell Infect Microbiol**, 8, p. 128, 2018.
- RUNKEL, E. D.; BAUMEISTER, R.; SCHULZE, E. Mitochondrial stress: balancing friend and foe. **Exp Gerontol**, 56, p. 194-201, Aug 2014.
- SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chains-terminating inhibitors. **Proceedings National Academic Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SEGAL, B. H. Aspergillosis. **N Engl J Med**, 360, n. 18, p. 1870-1884, Apr 2009.

SEGAL, B. H.; WALSH, T. J. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 173, n. 7, p. 707-717, Apr 2006.

SHAUKAT, A.; BAKRI, F.; YOUNG, P.; HAHN, T. *et al.* Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristics. **Mycopathologia**, 159, n. 2, p. 181-188, Feb 2005.

SHEDLOVSKIY, D.; SHCHERBIK, N.; PESTOV, D. G. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA Biol**, 14, n. 12, p. 1722-1726, 12 02 2017.

SHIOTA, T.; IMAI, K.; QIU, J.; HEWITT, V. L. *et al.* Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. **Science**, 349, n. 6255, p. 1544-1548, Sep 2015.

SHORE, G. C.; MCBRIDE, H. M.; MILLAR, D. G.; STEENAART, N. A. *et al.* Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. **Eur J Biochem**, 227, n. 1-2, p. 9-18, Jan 15 1995.

SMALL, W. C.; MCALISTER-HENN, L. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, 180, n. 16, p. 4051-4055, Aug 1998.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

SMITH, V.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 14, p. 6479-6483, Jul 1995.

SOUTHERN, J. A.; YOUNG, D. F.; HEANEY, F.; BAUMGÄRTNER, W. K. *et al.* Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. **J Gen Virol**, 72 (Pt 7), p. 1551-1557, Jul 1991.

SÖLLNER, T.; GRIFFITHS, G.; PFALLER, R.; PFANNER, N. *et al.* MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. **Cell**, 59, n. 6, p. 1061-1070, Dec 1989.

SUGUI, J. A.; KWON-CHUNG, K. J.; JUVVADI, P. R.; LATGÉ, J. P. *et al.* *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 5, n. 2, p. 1-17, Nov 2014.

TAUBITZ, A.; BAUER, B.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Curr Microbiol**, 54, n. 5, p. 354-360, May 2007.

TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Curr Opin Microbiol**, 8, n. 4, p. 385-392, Aug 2005.

TISSOT, F.; AGRAWAL, S.; PAGANO, L.; PETRIKKOS, G. *et al.* ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. **Haematologica**, 102, n. 3, p. 433-444, 03 2017.

TOMEI, J. F.; VAN DER WERF, T. S. Pulmonary aspergillosis. **Neth J Med**, 59, n. 5, p. 244-258, Nov 2001

TONIN, F. S.; STEIMBACH, L. M.; BORBA, H. H.; SANCHES, A. C. *et al.* Efficacy and safety of amphotericin B formulations: a network meta-analysis and a multicriteria decision analysis. **J Pharm Pharmacol**, 69, n. 12, p. 1672-1683, Dec 2017.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 9, p. 4350-4354, Sep 1979.

TRACY, M. C.; OKORIE, C. U. A.; FOLEY, E. A.; MOSS, R. B. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. **J Fungi (Basel)**, 2, n. 2, Jun 2016.

TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; SORIANI, F. M.; SANTOS, A. C. *et al.* In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, n. 1, p. 162-172, Jan 2004.

VAN DE VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; ROMANI, L.; NETEA, M. G. *et al.* *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 11, p. 661-674, Nov 2017.

VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; DE OLIVEIRA, H. C. F. *et al.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radic Biol Med**, 129, p. 1-24, Dec 2018.

VERNOCHET, C.; DAMILANO, F.; MOURIER, A.; BEZY, O. *et al.* Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. **FASEB J**, 28, n. 10, p. 4408-4419, Oct 2014.

VERWEIJ, P. E.; ANANDA-RAJAH, M.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C. *et al.* International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resist Updat**, 21-22, p. 30-40, 2015 Jul-Aug 2015.

VERWEIJ, P. E.; CHOWDHARY, A.; MELCHERS, W. J.; MEIS, J. F. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? **Clin Infect Dis**, 62, n. 3, p. 362-368, Feb 2016

VISSER, H.; JOOSTEN, V.; PUNT, P.J.; GUSAKOV, A.V. *et al.* Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. **Indust. Biotechnol**, 7, p. 214-223, Jul 2011.

VIVEK-ANANTH, R. P.; MOHANRAJ, K.; VANDANASHREE, M.; JHINGRAN, A. *et al.* Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 6617, 04 2018.

VIZIOLI, M. G.; LIU, T.; MILLER, K. N.; ROBERTSON, N. A. *et al.* Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. **Genes Dev**, 34, n. 5-6, p. 428-445, 03 01 2020.

VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 2, p. 615-619, Feb 1979.

VÖGTLE, F. N.; WORTELKAMP, S.; ZAHEDI, R. P.; BECKER, D. *et al.* Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. **Cell**, 139, n. 2, p. 428-439, Oct 2009.

WAIZENEGGER, T.; STAN, T.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. **J Biol Chem**, 278, n. 43, p. 42064-42071, Oct 24 2003.

WALTHER, D. M.; RAPAPORT, D. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1793, n. 1, p. 42-51, Jan 2009.

WASYLNKA, J. A.; SIMMER, M. I.; MOORE, M. M. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. **Microbiology (Reading)**, 147, n. Pt 4, p. 869-877, Apr 2001.

WAYNE ALBERS, R. **Cell Membrane Structures and Functions. In: BRADY, S. (Ed.). Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. 8 ed. Academic Press, 2012. cap. 2, p. 26-39.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochim Biophys Acta**, 1817, n. 10, p. 1833-1838, Oct 2012.

WIEDEMANN, N.; PFANNER, N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. **Annu Rev Biochem**, 86, p. 685-714, Jun 2017.

YAMAMOTO, H.; ITOH, N.; KAWANO, S.; YATSUKAWA, Y. *et al.* Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 1, p. 91-96, Jan 2011.

YAMANO, K.; YATSUKAWA, Y.; ESAKI, M.; HOBBS, A. E. *et al.* Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. **J Biol Chem**, 283, n. 7, p. 3799-3807, Feb 2008.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 201, n. 1, p. 255-265, Apr 1980.

ZHANG, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; DEBETS, A. J. M.; VERWEIJ, P. E. *et al.* Evolution of cross-resistance to medical triazoles in. **Proc Biol Sci**, 284, n. 1863, Sep 2017.

ZHANG, Z.; REN, Q. Why are essential genes essential? - The essentiality of. **Microb Cell**, 2, n. 8, p. 280-287, Jul 25 2015.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **Int J Mol Med**, 44, n. 1, p. 3-15, Jul 2019.

