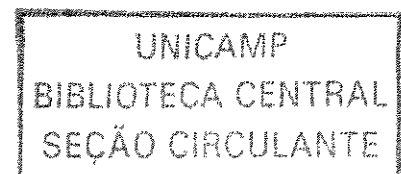


RENATA ALVES CAVALHEIRO

***ESTUDO DE METABOLISMO DE ENERGIA EM
LEVEDURAS DE INTERESSE MÉDICO***

CAMPINAS

2003



RENATA ALVES CAVALHEIRO

***ESTUDO DE METABOLISMO DE ENERGIA EM
LEVEDURAS DE INTERESSE MÉDICO***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, na Área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

CO-ORIENTAÇÃO: PROF. DR. ANÍBAL E. VERCESI

Angélica

CAMPINAS

2003

UNIDADE	BC
CHAMADA	UNICAMP
EX	
OMBO BC/	61679
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
REÇO	11,00
ATA	03/11/05
CPD	

3161d 338121

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C314e Cavalheiro, Renata Alves
Estudo de metabolismo de energia em leveduras de interesse médico
/ Renata Alves Cavalheiro. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Angélica Zaninelli Schreiber, Aníbal Eugenio Vercesi
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fungos. 2. Leveduras (fungos). 3. Mitocôndrias. 4.
Bioenergética. I. Angélica Zaninelli Schreiber. II. Aníbal Eugênio
Vercesi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora de Defesa de Tese de Mestrado

Orientador(a):

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber _____

Membros:

Profa Dra. Celene Fernandes Bernardes _____

Profa Dra. Márcia Marília Fagian _____

Prof Dr. Jiri Borecky _____

Profa Dra. Maria Magali S.R.Souares _____

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/08/03

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Arlei, com saudades...

À minha mãe, Ilenir, com orgulho...

À Deus...

Ao meu marido Luciano, pela ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Junior e Arleni, por fazerem parte da minha vida.

À Professora. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber pela oportunidade e orientação no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Aníbal E. Vercesi pela co-orientação e dedicação.

Aos funcionários, amigos e pós-graduandos do Laboratório de Microbiologia: Ana Beatriz, Belmira, Cidinha, Denise, Dalva, Deva, Edson, Eliane, Flor, Jandira, Luzia, Marcel, Marizete, Maria Rita, Odair, Patrícia, Rosa, Simone, Silvio, Wagner e em especial à Valéria pela amizade e convívio diário.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Bioenergética: Anna Maria, Adriana, Alexandre, Cláudia, Denise, Edilene, Elisangela, Evelise, Fabiane, Fátima, Felix, Jesus, Giovanna, Luciane, Márcia, Márcio, Michele, Natalia, Ricardo, Roger e Solange.

Ao meu amigo Jiri pelo ensino, ajuda e pela amizade no decorrer dos anos.

À Érica e a Professora Maria Alice do Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto,
é a coisa mais importante que temos.”*

Albert Einstein

	PÁG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Conceitos gerais sobre fungos.....	45
1.2- Candidíase, Criptococose e epidemiologia.....	47
1.21- Tratamento e profilaxia.....	50
1.3- Metabolismo de energia.....	53
1.3.1- Bioenergética mitocondrial e Cadeia respiratória.....	53
1.3.2- Homeostase intracelular de cálcio.....	56
1.3.3- Proteínas desacopladoras.....	59
1.3.3.1- Características estruturais das UCPs.....	60
1.3.3.2- Mecanismos de desacoplamento das UCPs.....	60
1.3.4- Oxidase alternativa.....	62
2- OBJETIVOS	65
3- MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1- Microrganismos avaliados.....	71
3.1.1- Manutenção das cepas.....	71
3.1.2- Meios de culturas.....	71
3.1.3- Reativação das cepas para estudo.....	71
3.2- Avaliação do crescimento das células de leveduras.....	72

3.2.1- Preparação do pré-inóculo.....	72
3.2.2- Preparação do inóculo.....	72
3.2.3- Obtenção das curvas de crescimento.....	72
3.2.4- Determinação do início da fase exponencial de crescimento e tempo de crescimento máximo.....	72
3.3- Dosagem de proteínas.....	73
3.4- Obtenção de esferoplastos.....	73
3.4.1- Enzimas.....	73
3.4.1.2- Curvas de permeabilização.....	73
3.4.2- Preparação de esferoplastos do gênero <i>Candida</i>	74
3.4.2.1- Microscopia eletrônica.....	74
3.4.2.2- Imunodeteção da UCP de <i>C. albicans</i> (CaUCP).....	75
3.4.3- Preparação de esferoplastos do gênero <i>Cryptococcus</i>	75
3.5- Isolamento de mitocôndrias.....	75
3.6- Avaliações metabólicas.....	76
3.6.1- Meio de reação padrão.....	76
3.6.2- Determinação do consumo de oxigênio.....	76
3.6.3- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial.....	76
3.6.4- Atividade de bomba de prótons.....	77
4- RESULTADOS.....	79
4.1- Cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.....	81
4.1.1- Curvas de crescimento.....	81
4.1.2- Curvas de permeabilização.....	83
4.1.3- Microscopia eletrônica de células e esferoplastos de <i>C. albicans</i>	85

4.1.4- Experimentos realizados em esferoplastos de <i>C. albicans</i> obtidos a partir de crescimento de células em meio YEPG.....	86
4.1.4.1- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e respiração celular.....	86
4.1.4.2- Avaliação do efeito de adições de ATP e BSA.....	87
4.1.4.3- Avaliação do efeito da adição de LA e BSA.....	88
4.1.4.4- Avaliação do efeito da adição de ADP.....	89
4.1.4.5- Avaliação do efeito da adição de vanadato e da nigericina.....	90
4.1.4.6- Avaliação do efeito da adição de Ca^{2+} e da nigericina.....	91
4.1.5- Experimento realizado em mitocôndrias isoladas de <i>C. albicans</i> obtidas por crescimento em meio YEPG.....	92
4.1.5.1- Avaliação do efeito do LA na fosforilação oxidativa.....	92
4.1.6- Imunodeteção de UCP.....	93
4.2- Cepa de <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.....	94
4.2.1- Curvas de crescimento.....	94
4.2.2- Curvas de permeabilização.....	96
4.2.3- Experimentos realizados em esferoplastos de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 obtidas por crescimento em meio YEPD.....	98
4.2.3.1- Avaliação do efeito da adição de ADP.....	98
4.2.3.2- Avaliação do efeito da adição de ATP e BSA.....	99
4.2.3.3- Avaliação de efeito da adição de LA e BSA.....	100
4.2.3.4- Avaliação do efeito da adição de nigericina e bafilomicina.....	101

4.2.3.5- Avaliação do efeito da adição de nigericina e vanadato	102
4.2.3.6- Avaliação do efeito da adição de Ca^{2+} e nigericina.....	103
4.3- Cepa de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	104
4.3.1- Curvas de crescimento.....	104
4.3.2- Curvas de permeabilização.....	106
4.4- Cepa de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112.....	108
4.4.1- Curvas de crescimento.....	108
4.4.2- Curvas de permeabilização.....	110
5- DISCUSSÃO.....	113
6- CONCLUSÃO.....	123
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
8- ANEXOS.....	141
Anexo 1- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 em meio YEPD.....	143
Anexo 2- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 em meio YEPG.....	145
Anexo 3- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em meio YEPD.....	147
Anexo 4- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em meio YEPG.....	149
Anexo 5- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 em meio YEPD.....	151
Anexo 6- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 em meio YEPG.....	153

Anexo 7- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 em meio YEPD.....	155
Anexo 8- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 em meio YEPG.....	157
Anexo 9- Trabalho completo submetido para publicação na revista FEBS: Uncoupling Protein in <i>Candida albicans</i>	159

LISTA DE ABREVIATURAS

	Inglês	Português
AA	Antimycin A	Antimicina A
ADP	Adenosine diphosphate	Adenosina difosfato
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AO	Acridine orange	Laranja de acridine
AOX	Alternative oxidase	Oxidase alternativa
AMB	Amphotericin B	Anfotericina B
ASD	Agar Saboraud dextrose	Ágar Saboraud dextrose
ATCC	American type culture collection	
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosina trifosfato
BAT	Brown-adipose tissue	Tecido adiposo marrom
BHAM	Benzohydroxamic acid	Ácido benzohidroxâmico
BHI	Brain heart infusion	Infusão de cérebro coração
BSA	Bovine serum albumin	Albumina bovina sérica
CaUCP	<i>C. albicans</i> plant uncoupling	Proteína desacopladora de <i>C. albicans</i>
CAT	Carboxyatractyloside	Carboxiatractilósídeo
CRC	Cadeia respiratória de citocromos	Cytochrome respiratory chain
5-FC	5- fluocitosin	5-flucitosina
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) [3.3.1.1 ^{3,7}] decane}-4-yl) phenylphosphate	tricyclo
$\Delta\Psi$	Mitochondrial membrane potential	Potencial de membrana mitocondrial
OD	Optics density	Densidade óptica

DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etileno glycol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetra acético	
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxylhydrazone	
FFA	Free fatty acid	Ácidos graxos livres
FLCZ	Fluconazole	Fluconazol
GMP	Guanosine 5-Monophosphate	Guanosina monofosfato
HEPES	<i>(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])</i>	
ITCZ	Itraconazole	Itraconazol
KCl	Potassium chloride	Cloreto de potássio
KCN	Potassium cianede	Cianeto de potássio
LA	Linoleic acid	Ácido linoleico
PAR	Parallel respiratory chain	Cadeia respiratória paralela
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	
$\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$	Proton eletrochemical gradient	Gradiente eletroquímico de prótons
PUMP	Plant uncoupling mitochondrial protein	Proteína mitocondrial desacopladora em planta
ROS	Reactive oxygen species	Espécie reativa de oxigênio
Qx	Alternative ubiquinone	Ubiquinona alternativa
SHAM	Salicy hidroxic acid	Ácido hidroxâmico salicílico
TMO	Boné marrow transplant	Transplante de medula óssea
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	
UCP	Uncoupling protein	Proteína desacopladora
UQ		Forma oxidada da coenzima Q
UQH2		Forma reduzida da coenzima Q

	PÁG.
Figura 1- Curva de crescimento de microrganismos.....	46
Figura 2- Anatomia bioquímica de uma mitocôndria.....	53
Figura 3- Fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória.....	54
Figura 4- Dois possíveis mecanismos de ação da proteína desacopladora demonstrando o transporte de elétrons e a participação dos ácidos graxos.....	60
Figura 5- Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 em meio YEPD.....	81
Figura 6- Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 em meio YEPG.....	82
Figura 7- Curva de permeabilização de células de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 obtida por crescimento em meio YEPD com a enzima liticase.....	83
Figura 8- Curva de permeabilização de células de <i>C. albicans</i> ATCC 90028, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase.....	84
Figura 9- Microscopia eletrônica de células de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	85
Figura 10- Microscopia eletrônica de esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	85
Figura 11- Efeito de vários substratos e inibidores no consumo de oxigênio (A) e no potencial de membrana mitocondrial (B) em esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	86

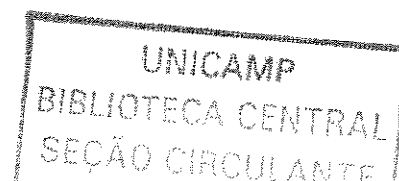


Figura 12-	Efeito de 5 mM ATP e 0,5% BSA no $\Delta\Psi$ mitocondrial em esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 na presença de 1 μ M CAT utilizando a metodologia da safranina O	87
Figura 13-	Diminuição no potencial de membrana de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 induzido pelo ácido linoleico.....	88
Figura 14-	Fosforilação do ADP em mitocôndrias de esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	89
Figura 15-	Acúmulo de acidine orange dirigido por ATP em esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	90
Figura 16-	Acúmulo de acridine orange dirigida por ATP em esferoplastos de <i>C. albicans</i> ATCC 90028	91
Figura 17-	Efeito do LA na fosforilação oxidativa.....	92
Figura 18-	Imunodeteção da proteína descopladora de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 com anticorpo polyclonal contra PUMP1 de <i>Arabidopsis</i>	93
Figura 19-	Curva de crescimento de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em meio YEPD...	94
Figura 20-	Curva de crescimento de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em meio YEPG...	95
Figura 21-	Curva de permeabilização de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima liticase....	96
Figura 22-	Curva de permeabilização de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase....	97
Figura 23-	Efeito do ADP no potencial de membrana em esferoplastos de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 evidenciados com safranina O.....	98
Figura 24-	Efeito do ATP e BSA no potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de células de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 na presença de 1 μ M carboxyatractilosídeo (CAT).....	99

Figura 25-	Diminuição no potencial de membrana em esferoplastos de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 induzido pelo ácido linoleico.....	100
Figura 26-	Acidificação vacuolar dependente de ATP em esferoplastos de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 pelo efeito da nigericina e da bafilomicina.....	101
Figura 27-	Acidificação vacuolar dependente de ATP em esferoplastos de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 pelo efeito da nigericina e do vanadato.....	102
Figura 28-	Liberação da acridine orange do compartimento áido induzida por Ca^{2+} em esferoplastos de células de <i>C. krusei</i>	103
Figura 29-	Curva de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 em meio YEPD.....	104
Figura 30-	Curva de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 em meio YEPG.....	105
Figura 31-	Curva de permeabilização de células de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima liticase.....	106
Figura 32-	Curva de permeabilização de células de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase.....	107
Figura 33-	Curva de crescimento de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 em meio YEPD.....	108
Figura 34-	Curva de crescimento de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 em meio YEPG.....	109
Figura 35-	Curva de permeabilização de células de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima Lysing enzymes.....	110

Figura 36-	Curva de permeabilização de células de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima Lysing enzymes.....	111
-------------------	--	-----

RESUMO

Nos últimos 15 anos, as infecções sistêmicas por patógenos fúngicos oportunistas vêm aumentando assustadoramente. Entretanto, as alternativas terapêuticas continuam restritas. Em busca de novos alvos para alternativas terapêuticas, este trabalho busca conhecer melhor o metabolismo de algumas leveduras. Assim, foram estabelecidas curvas de crescimento para *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, e determinados os tempos para início da fase exponencial, metabolicamente mais ativa. Para os estudos, necessita-se de células permeáveis a íons, assim, avaliou-se a produção de esferoplastos, com a determinação dos tempos de contato com a enzima específica para cada espécie. Avaliando mitocôndrias *in situ* e isoladas de *C. albicans* ATCC 90028, testes bioquímicos apontaram a presença de uma proteína desacopladora, confirmada por imunodeteção. Foi também possível sugerir a presença desta proteína em *Candida krusei* ATCC 6258. Pode-se relatar a presença de vacúolo ácido nas células de *Candida albicans* ATCC 90028 e sugerir sua presença nas células de *Candida krusei* ATCC 6258. A cepa de *C. albicans* ATCC 90028 também possui um P-type H^+ ATPase sensível a ortovanadato e insensível a bafilomicina e não possui trocador Ca^{2+}/H^+ , por sua vez, *C. krusei* possui um P-type H^+ ATPase insensível a bafilomicina, sensível a ortovanadato e um trocador Ca^{2+}/H^+ . Características como uma cadeia alternativa para a transferência de elétrons, de oxidase alternativa e proteínas desacopladoras, são potenciais alvos para estudos de alternativas terapêuticas para tratamento de infecções por estes agentes. Maior aprofundamento dos estudos aqui iniciados, poderão trazer grandes contribuições para um melhor conhecimento do metabolismo destes agentes infecciosos.

ABSTRACT

In the last 15 years, opportunistic systemic fungal are increasing. However, the therapeutical alternatives are still restricted. In search of new targets for therapeutical drugs, this work proposes to understand better the metabolism of some yeasts. Growth curves of *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 was performed and the middle of the exponential phase of growth was determinated. For metabolic studies, is necessary to obtain permeable cells, withouth cell wall. In order to have spheroplasts, the time of contact with the specific enzyme for each specie was evaluated. Biochemical tests, evaluating *in situ* and isolated *C. albicans* ATCC 90028 mitochondria showed the existence of an uncoupling protein, confirmed by imunodetection. It was also possible to suggest the presence of this protein in *Candida krusei* ATCC 6258. Also can be related an acid vacuole in *Candida albicans* ATCC 90028 and suggest its presence in *C. krusei* ATCC 6258 cells. *C. albicans* ATCC 90028 strain also possess a P-type H^+ ATPase sensible to orthovanadate and insensible to bafilomycin and does not have an Ca^{2+}/H^+ exchanger, in turn, *C. krusei* ATCC 6258 possess a P-type H^+ ATPase insensible to bafilomicin, sensible to ortovanadate and a Ca^{2+}/H^+ exchanger. Characteristics as an alternative chain to electrons transference, alternative oxidase and uncoupling proteins are potential targets to alternative therapeutic studies for treatment of infections caused by these agents. More studies in addition to these initiated here, will be of great contribution for a better knowledge of these infectious agents.

1- INTRODUÇÃO

1.1- CONCEITOS GERAIS SOBRE FUNGOS

Até meados do século XX, os fungos eram incluídos no Reino *Plantae* ou *Vegetaliae*, provavelmente porque alguns deles eram estruturalmente parecidos com os vegetais superiores. Em 1969, Whittaker et al., evidenciando o fato de que os fungos não atendiam características básicas para permanecerem no reino vegetal, uma vez que eles não possuíam pigmento fotossintético, apresentavam parede de quitina e não de celulose e, finalmente armazenavam glicogênio e não amido, sugeriram a criação de um reino à parte, o Reino *Fungi* (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Os fungos são seres eucarióticos, possuem membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. No seu citoplasma, a célula fúngica apresenta, imersas neste fluido, algumas organelas como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas mitocondriais e vacúolos (SIDRIN e MOREIRA, 1999). O Reino Fungi divide-se em fungos macroscópicos e microscópicos que, por sua vez, apresentam duas estruturas morfológicas distintas: filamentosa e leveduriforme.

A unidade fundamental dos fungos filamentosos é uma estrutura filiforme denominada hifa. Um conjunto de hifas forma um micélio. A porção do micélio que penetra no substrato, ou meio de cultura, é o micélio vegetativo; a porção do micélio que se projeta acima do substrato forma o micélio aéreo ou reprodutivo (KONEMAN et al., 1993).

As leveduras são unicelulares e se distinguem dos fungos filamentosos pela maneira de se reproduzirem: por brotamento, brotamento-fissão e divisão binária. No brotamento, em algum lugar da parede celular aparece um broto que é a célula filha. O mecanismo de brotamento fissão é idêntico ao de brotamento, mas a célula filha se destaca da mãe, evoluindo na maturidade até atingir o tamanho da célula que a originou. Na divisão binária, a parede celular sofre uma invaginação dando origem a duas células com as mesmas características.

O tempo de geração varia dentre os diferentes gêneros e até entre espécies de um mesmo gênero, a dependência do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação e disponibilidade de oxigênio.

A curva de crescimento de uma espécie de levedura, quando em meio de cultura líquido, pode ser representada por um gráfico com quatro fases.

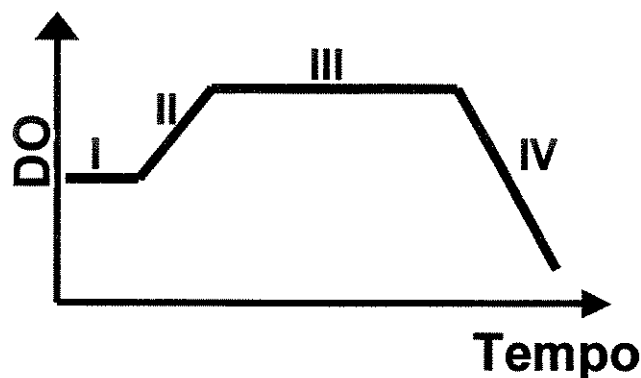


Figura 1- Curva de crescimento de microrganismos: (I) fase LAG também conhecida como fase de adaptação ou latência, é o período em que a população se adapta ao meio em que se encontra, iniciando a produção de metabólitos essenciais para o seu desenvolvimento; (II) fase exponencial ou logarítmica é a fase na qual a multiplicação ocorre com maior velocidade, aumentando exponencialmente a população; (III) fase estacionária, onde o número de células viáveis permanece aproximadamente constante por causa do acúmulo de substâncias tóxicas liberadas pelas próprias leveduras no meio e redução da quantidade de nutrientes e (IV) fase de morte celular ou declínio (BARBOSA et al., 1999).

As células das leveduras são geralmente ovais ou arredondadas, podendo algumas vezes apresentar formas alongadas e irregulares. A cultura, em meio sólido, é úmida, cremosa e de textura membranosa, podendo as colônias ser hialinas, coloridas ou pretas (pela pigmentação produzida na presença de melanina). Algumas podem produzir cápsulas como as espécies de *Cryptococcus*. (SIDRIN et al., 1999; LARONE et al., 1995; WARREN et al., 1999).

Uma característica importante das leveduras é a formação de pseudo-hifas, onde os blastoconídios são formados de maneira linear sem separações. Essas estruturas são formadas por motivos ainda não bem explicados, mas que alguns autores relacionam com a virulência da espécie (LARONE et al., 1995; WARREN et al., 1999; SIDRIN et al., 1999).

Embora haja muitos gêneros e centenas de espécies de leveduras, somente 10% produzem doenças nos seres humanos e animais. As leveduras podem ser identificadas pela observação microscópica de suas estruturas desenvolvidas em meios de cultura específicos, em adição a testes fenotípicos e genotípicos, se necessário (LARONE et al., 1995; WARREN et al., 1999; LUNEL et al., 1999).

As leveduras do gênero *Candida* são habitantes normais do trato genital feminino e gastrointestinal, freqüentes no solo, alimentos e ambiente hospitalar, podendo, desta forma, causar infecções em pacientes imunodeprimidos, sendo consideradas patógenos oportunistas (WARREN et al., 1999).

C. neoformans var. *neoformans* é cosmopolita e freqüentemente isolado em excretas de pombos, enquanto *C. neoformans* var. *gatti* está limitado a certas regiões tropicais e subtropicais, tais como o sul da Califórnia e a região oeste da Austrália, onde foram isolados em eucaliptos (KWON-CHUNG et al., 1982; KWON-CHUNG et al., 2000).

1.2- CANDIDÍASE, CRIPTOCOCOSE E EPIDEMIOLOGIA

Nos últimos 15 anos as infecções oportunistas causadas por espécies de *Candida* têm aumentado substancialmente, tornando-se um problema cada vez maior em pacientes com câncer, especialmente entre os receptores de transplante de medula óssea (WRIGHT et al., 1997; HOVI et al., 2000).

No Brasil, NUCCI et al., em 1998, observaram um aumento de 3% para 19% na freqüência de infecções fúngicas em pacientes com câncer. Esse aumento tem sido largamente atribuído a neutropenia prolongada, ruptura da barreira mucosa por intensiva quimioterapia, uso de cateteres e antibióticos de amplo espectro, terapia com imunossupressores, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), hiperalimentação e estendidos períodos de hospitalização (MOMIM et al., 1995; HOVI et al., 2000).

Altas doses de quimioterapia, bem como, os períodos de condicionamento prévio ao transplante, resultam em granulocitopenia (MOMIM et al., 1995). A neutropenia é o principal fator de risco para desenvolvimento de infecções graves em pacientes com

câncer, pois os neutrófilos representam a linha de defesa primária para uma série grande de patógenos (HOPPE et al., 1995; NUCCI, 2000).

Em pacientes neutropênicos, 80% das infecções são causadas por microrganismos que colonizam o local, a partir do qual as infecções se desenvolvem. Aproximadamente 50% dessas infecções são causadas por colonizantes que já haviam sido adquiridos pelo paciente antes de sua internação no hospital. As principais portas de entrada para infecções nesses pacientes são pele, trato respiratório superior e trato gastrointestinal (NUCCI, 2000). A colonização em múltiplos locais, em contraste à colonização em um único local, é altamente preditiva para candidíase invasiva em pacientes neutropênicos (LORTHOLARY e DUPONT, 1997).

O dano à mucosa da orofaringe pelo uso de drogas citostáticas agressivas, facilita a colonização e subsequente infecção por espécies de *Candida*, assim como, o uso de antibióticos de amplo espectro alteram, tanto a composição quanto o balanço ecológico da microbiota do trato digestivo, geralmente colonizado por um grande número de bactérias e leveduras. Isto leva a uma colonização por microrganismos exógenos, e um crescimento ilimitado de microrganismos endógenos, potencialmente patogênicos (GUIOT et al., 1992, FERRA et al., 1994).

Em pacientes com malignidades hematológicas e submetidos a transplante de medula óssea (TMO) foi demonstrado que a colonização e subsequente infecção por espécies de *Candida* foi idêntica em 94% dos pacientes (VOSS et al., 1994). A inserção de cateter venenoso central predispõe pacientes neutropênicos a fungemia, especialmente aqueles que estão recebendo nutrição parenteral (SCHMID et al., 1995). Em 1999, COLOMBO et al., relataram que 63% dos episódios de candidemia eram causados por espécies de *Candida* não albicans, dentre estes 25% por *C. parapsilosis* e 24% por *C. tropicalis*. A fungemia causada por *C. parapsilosis* é mais comum em pacientes que estão recebendo nutrição parenteral e fazendo uso de cateter venenoso central, provavelmente pela sua capacidade de aderir a dispositivos inanimados e de proliferar em altas doses de glicose (BRANCHINI et al., 1994; WRIGHT e WENZEL, 1997; LUNEL et al., 1999). Cepas de *C. tropicalis*, nos Estados Unidos, tem sido predominantemente isoladas de crianças com leucemia e pacientes submetidos a TMO (LUNEL et al., 1999).

Infecção disseminada causada por *C. krusei* tem aumentado em pacientes neutropênicos e submetidos a TMO, sendo este fato atribuído, em parte, ao uso profilático de fluconazol (WINGARD et al., 1991; WRIGHT e WENZEL, 1997).

Candida krusei é intrinsecamente resistente a fluconazol e vêm emergindo como uma causa de fungemia em pacientes com hemopatias malignas, com índice de mortalidade de 49% em comparação com 28% atribuídos a fungemias por *C. albicans*. Em pacientes neutropênicos, portanto, *C. krusei* é associada à alta mortalidade e deve ser suspeitada em pacientes que receberam profilaxia com fluconazol (ABBAS et al., 2000).

Os mecanismos de resistência de *C. krusei* ao fluconazol têm sido investigados dentre 1) enzima 14^α-demetilase; 2) acúmulo reduzido da droga mediada por redução da captação ou aumento do efluxo e 3) deficiência de C5(6) desaturase que induz a produção de 14-methyfecosterol, que se mantém viável quando a atividade da 14^α-demetilase é inibida (OROZCO et al., 1998).

A tolerância ao antifúngico pode ser entendida através da capacidade que as leveduras possuem em sobreviver na presença de concentrações de drogas suficientes para inibir o seu crescimento. Esta tolerância é especialmente evidenciada frente a drogas antifúngicas que exercem somente ação fungistática em leveduras patogênicas, que é o caso dos antifúngicos azóis e algumas espécies de *Candida*. A *C. parapsilosis* é reconhecida como o importante agente causal de candidemia em unidades de tratamentos intensivos neonatal (HUANG et al., 2000). *C. krusei* e *C. tropicalis* são mais comumente quando associadas a infecções sistêmicas em pacientes com malignidades hematológicas, enquanto que *C. albicans* e *C. tropicalis* são predominantes em tumores sólidos (MEUNIER et al., 1992).

Acredita-se que a criptococose é adquirida pela inalação dos basidiosporos produzidos pelo *C. neoformans* (forma sexuada), freqüentemente encontradas na natureza (LACAZ et al., 1991). *C. neoformans* presentes nas excretas de pombo dessecadas medem não mais que 1 µm de diâmetro, sendo, portanto compatíveis ao tamanho dos alvéolos pulmonares humanos. A população mais atingida é representada pelos pacientes imunossuprimidos por doenças linfoproliferativos, transplantados submetidos a esquemas

de imunossupressão e, mais recentemente, pelos pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LACAZ et al., 1991).

Diferença epidemiológica entre as variedades desperta a atenção no meio médico, já que *C.neoformans* var. *neoformans* é mais freqüente em pacientes imunodeprimidos cujo grupo apresenta alta mortalidade, enquanto a variedade *gatti* afeta principalmente pacientes imunocompetentes (LEVITZ, 1991).

1.2.1- Tratamento e Profilaxia

O tratamento das infecções fúngicas, incluindo a criptococose, é limitado devido às escassas opções terapêuticas, falhas na resposta clínica, resistência à terapia e toxicidade (ELEWSKI e OHIO, 1993; EPSTEIN et al., 1996). Agentes antifúngicos convencionais são geralmente fungistáticos, apresentando problemas principalmente em pacientes com sistema imune prejudicado. Esses agentes apenas impedem o crescimento fúngico proporcionando um rápido relapso ou uma incompleta erradicação do microrganismo. Somente a inibição do crescimento fúngico pode não ser suficiente para prevenir a disseminação do microrganismo nesses pacientes (ELEWSKI e OHIO, 1993).

As drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves, são a anfotericina B (AMB), a 5- flucitosina (5-FC) e os derivados azólicos, como o fluconazol (FLCZ) e itraconazol (ITCZ).

A anfotericina B, poliênico de ação fungicida (*in vitro*), se liga fisicamente ao ergosterol da membrana celular, rompendo a célula fúngica, causando extravasamento dos seus componentes e eventualmente morte celular (ELEWSKI e OHIO, 1993). Sua fórmula convencional é pouco tolerada, com alto risco de comprometimento renal, principalmente se administrada concomitantemente a tratamento com outras drogas nefrotóxicas, tais como quimioterápicos, aminoglicosídeos, vancomicina e ciclosporina (CESARO et al., 1993, SUGAR, 1990). No entanto, a anfotericina B ainda permanece a droga de escolha para suspeita e confirmação de infecção fúngica sistêmica (TOLLEMAR et al., 1999; ROCCO et al., 2000).

Nos últimos 30 anos, anfotericina B, conhecida por sua nefrotoxicidade, era a única droga disponível para o controle de infecções fúngicas. A aprovação dos imidazólicos e os triazólicos nos anos 80 e 90 representaram um grande avanço em se tratando de eficácia e segurança para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (GHANNOUM e RICE, 1999).

Cetoconazol, fluconazol e itraconazol inibem a síntese do ergosterol, interagindo com citocromo P-450, enzima responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (ELEWSKI e OHIO, 1993; CHRISTINE e TERREL, 1999). Devido à enzima citocromo P-450 de mamíferos estar envolvida com síntese de importantes esteróides como testosterona, cortisol e aldosterona, drogas com uma afinidade por esta enzima podem estar associadas com toxicidade. Dentre os azóis, o efeito menos tóxico do fluconazol, o torna o mais usado no tratamento e profilaxia de candidíases (TOLLEMAR et al., 1999; KANDA et al., 2000). Existem ainda três novos triazóis que estão sendo desenvolvidos para o uso clínico, são eles posaconazol, ravuconazol e voriconazol (SANGLARD et al., 1999).

A caspofungina, anidulofungina e micafungina representam os novos antifúngicos da equinocandinas, que são inibidores específicos dos polímeros de β -glucanase na parede celular dos fungos. A flucitosina inibe a síntese de DNA e RNA em leveduras patogênicas como é o caso de espécies de *Candida* e *Cryptococcus spp* e está sendo avaliada durante muitos anos por ser administrada em combinação a poliênicos ou triazóis (SANGLARD et al., 1999).

A profilaxia antifúngica é obrigatória em pacientes submetidos a TMO, pois a incidência de colonização por espécies de *Candida* nestes pacientes corresponde a 76%. O patógeno pode ganhar a corrente sangüínea a partir da superfície mucosa colonizada. O regime profilático (oral e tópico) com antifúngicos poliênicos, como, nistatina e anfotericina B, não tem demonstrado bons resultados. Por sua vez, a profilaxia sistêmica com fluconazol tem prevenido muitas infecções por espécies de *Candida*, mas também tem proporcionado o surgimento de espécies resistentes como *C. krusei* e *C. glabrata* (SLAVIN et al., 1995; TOLLEMAR et al., 1999).

A terapêutica e profilaxia com o uso de agentes antifúngicos como anfotericina B, e os azóis (os quais são administrados por longos períodos), têm aumentado os relatos de resistência antifúngica (POSTERARO et al., 2000).

Cepas de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krsuei* e *C. lusitaniae* possuem uma maior propensão ao desenvolvimento de resistência a anfotericina B, um ponto que deveria ser controlado para com os pacientes infectados com estas espécies (COLLIN et al., 1999).

Com as limitadas opções terapêuticas para o tratamento de micoses severas, há uma grande necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, em especial para o tratamento de candidíase sistêmica (KLEPSER et al., 1998).

Uma vez que os fungos são patógenos eucarióticos, é necessário conhecer detalhadamente estes agentes causais; suas vias metabólicas, em busca de peculiaridades que possam ser avaliadas como possíveis alvos, mais seletivos, para ação de drogas terapêuticas.

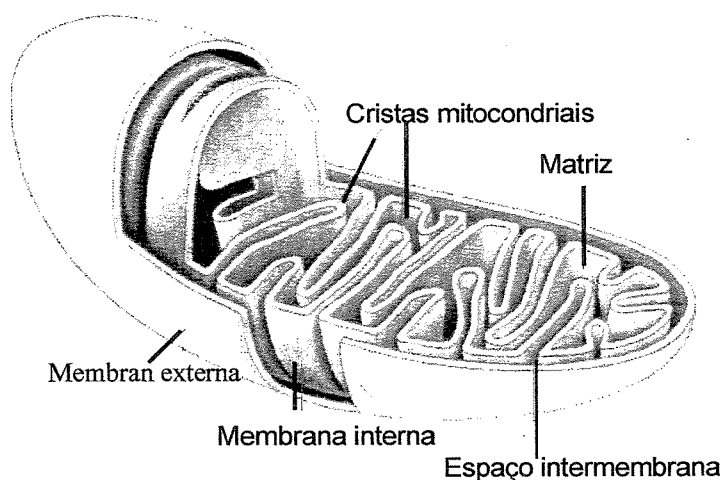
As células das leveduras possuem uma parede celular que é impermeável a substratos e para que a entrada destes substratos seja possível há necessidade de permeabilizá-las através de enzimas que digerem esta parede celular. Sendo assim em 1982 experimentos realizados com mitocôndria de *C. albicans* avaliando o efeito do antifúngico cetoconazol, o crescimento das células eram realizados durante 16h em meio de cultura líquido suplementado com glicose e a enzima utilizada para a digestão da parede celular era a zimoliase (SHIGEMATSU et al., 1982). Em 1987, Camougrand et al., compararam os resultados de células de *C. parapsilosis* crescidas até a fase estacionária em meio de cultura suplementado com dextrose e com glicerol e observaram que em dextrose apenas 27% de ATP era produzido pela respiração celular enquanto que em meio suplementado com glicerol 100% de ATP era produzido pela respiração (CAMOUGRAND, 1987). Em 2001, Milani et al., estudaram os esferoplastos de *C. parapsilosis*, estas eram crescidas até a metade da fase exponencial e eram permeabilizadas com a enzima liticase (MILANI et al., 2001). A *C. albicans* foi estudada em 2002, por Helmerhorst et al., suas células eram crescidas até a fase estacionária e zimoliase 100 T era utilizada para obtenção de esferoplastos.

1.3- METABOLISMO DE ENERGIA

1.3.1- Bioenergética mitocondrial e cadeia respiratória

Bioenergética mitocondrial

Mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção de energia celular necessária para o metabolismo. Estas convertem a energia derivada dos combustíveis químicos em energia armazenada sobre a forma de ATP, usado para prover muitas reações celulares dependentes de energia. Estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais.



www.juvenon.com/science.html

Figura 2- Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. As mitocôndrias dos invertebrados, plantas e microrganismos eucarióticos são semelhantes, embora haja uma variação no tamanho, na forma e no grau das cristas da membrana interna.

Cadeia respiratória

A energia necessária para o processo de fosforilação provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o O_2 à H_2O . Esta energia é utilizada pela ATP sintetase para fosforilar ADP à ATP. Assim, é a cadeia respiratória que controla a energia redox necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa (LEHNINGER, et al., 1995).

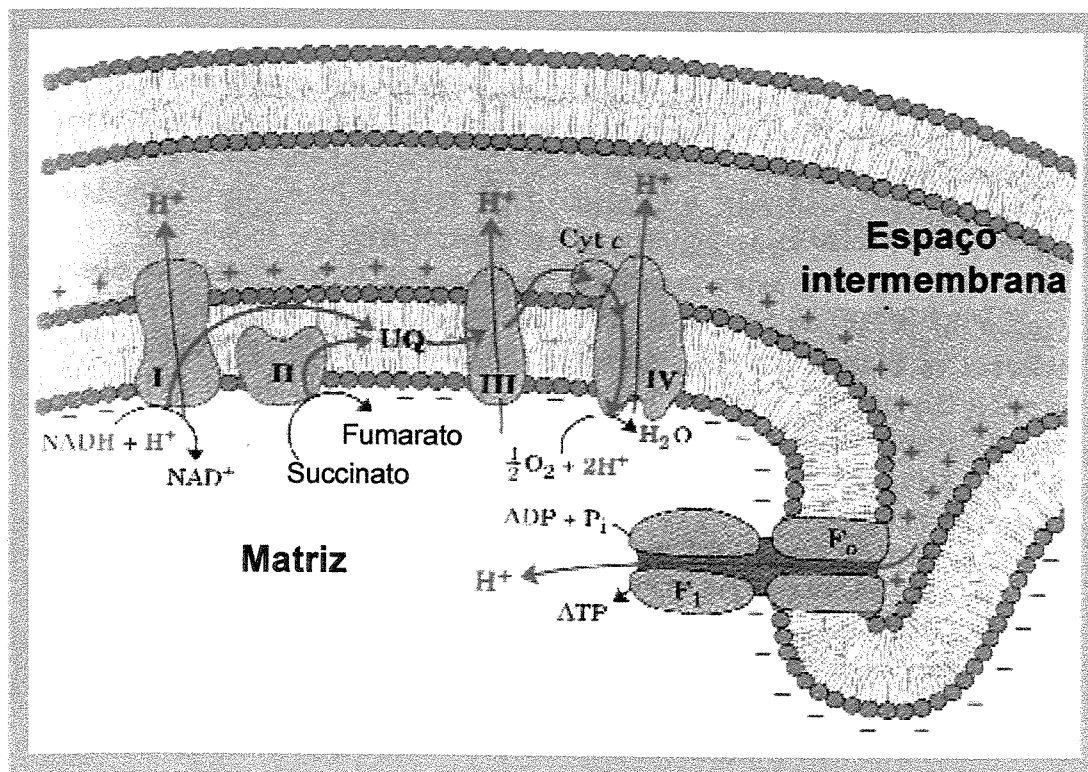


Figura 3- Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória (Leninger, 1995). Os elétrons alcançam a UQ via Complexos I e II. UQH_2 funciona como um transportador móvel de elétrons e prótons. Ele passa elétrons ao Complexo III, que os passa a uma outra conexão móvel, o citocromo c . O Complexo IV transfere elétrons do citocromo c reduzido ao O_2 . O fluxo de elétrons pelos Complexos I, III e IV é acompanhado do fluxo de prótons da matriz para o espaço intermembranoso (LEHNINGER, et al., 1995).

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos a NADH desidrogenase. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos a coenzima Q pode também ser reduzida pelo glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxiredutase (como resultado da β -oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH⁻). Existem dois conjuntos separados de UQH⁻, um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. Este transfere elétrons a citocromo oxidase (complexo IV) que é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (NICHOLLS e FERGUSON, 2002-a).

Segundo Peter Mitchell (1979), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H⁺ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acompanhamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O fluxo de H⁺ através da F₀F₁-ATP sintetase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado a fosforilação do ADP. A ATP sintetase, responsável por esta reação, é constituída de duas regiões bem distintas denominadas F₁, solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região F₀, hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (LEHNINGER, et al., 1995).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) é elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente

pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de ATP^{4-} por ADP^{3-} , a redução de NAD(P) pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca^{1+} que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria (LEHNINGER et al., 1995).

A levedura *Candida parapsilosis* apresenta características muito peculiares a nível bioenergético. Sua mitocôndria possui duas cadeias respiratórias: a cadeia respiratória clássica (vias do citocromos CRC) e uma segunda via oxidativa (PAR) (GUÉRIN et al., 1989) que é muito diferente das oxidases alternativas encontradas em diversas plantas e microorganismos (HILL e DEGN, 1977; MOORE e SIEDOW, 1991).

Em 1994, foi descrito por GUÉRIN e CAMOUGRAND um modelo de cadeia respiratória de *Candida parapsilosis* na qual a segunda via alternativa (PAR) é insensível a antimicina A e inibida por amitral (CAMOUGRAND et al., 1988), SHAM e altas concentrações de mixotiazol (CAMOUGRAND et al., 1991) ou cianeto (GUÉRIN et al., 1989). Esta segunda via alternativa seria paralela à cadeia dos citocromos com a possibilidade dos elétrons serem desviados para a cadeia dos citocromos ao nível do complexo *bc1* (GUÉRIN e CAMOUGRAND, 1986; CAMOUGRAND et al., 1993). Anteriormente, GUÉRIN et al., 1989 e CAMOUGRAND et al., em 1991 descreveram que a oxidação de substratos exógenos como NADH, NADPH e glicérol trifosfato se davam preferencialmente através dessa segunda alternativa e propuseram que esta seria uma reposição funcional da via fermentativa, que não está presente em *C. parapsilosis*, permitindo assim que a mesma cresça em ambientes não fermentativos e na presença de drogas que inibem o fluxo de elétrons mitocondriais (CAMOUGRAND et al., 1986).

1.3.2- Homeostase intracelular de cálcio

O íon Ca^{2+} exerce papel essencial no controle de uma série de funções celulares devido à sua propriedade de transmitir sinais para o interior da célula (CARAFOLI et al., 1987; GUNTER et al., 1994), como exemplos podem citar o controle da contração muscular ou liberação de neurotransmissores (CARAFOLI et al., 1987).

A atuação do Ca^{2+} como segundo mensageiro é distribuída entre os compartimentos extra e intracelular e é regulada por mecanismos de alta precisão, para que possam ocorrer rápidas flutuações na sua concentração. O alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} através de membrana plasmática, proteínas de membrana capazes de se unir com o Ca^{2+} , transportá-lo através da membrana e liberá-lo do outro lado e proteínas solúveis com capacidade de ligar o Ca^{2+} reversivelmente e processar a informação trazida pelo íon são fundamentais para a atuação de Ca^{2+} (CARAFOLI et al., 1987).

A concentração do Ca^{2+} no citosol é cerca de 10.000 vezes menor do que a concentração extracelular. Assim pequenos aumentos na permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} geram um rápido fluxo íon para o interior das células (CARAFOLI et al., 1987).

A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte do íon através da membrana plasmática e das membranas das organelas subcelulares como retículo endoplasmático, núcleo e mitocôndria (CARAFOLI et al., 1987; GUNTER e PFEIFFER, 1990). As membranas de células eucarióticas possuem proteínas que participam do transporte de Ca^{2+} e são responsáveis pela sua regulação fina; além dos trocadores iônicos, canais e transportadores eletroforéticos que possuem baixa afinidade pelo Ca^{2+} porém alta velocidade de transporte e são responsáveis pelas variações rápidas nas concentrações do íon (CARAFOLI et al., 1987; BASSANI e BERS, 1992).

O influxo de Ca^{2+} para dentro da célula é medido por canais específicos modulados por voltagem e canais modulados por receptores ou canais operados pelo armazenamento. A saída pode ocorrer por processo ativo mediado pela Ca^{2+} -ATPase ou por trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ particularmente em células de tecidos excitáveis (BERRIDGE et al., 1997). Em células de tecidos não excitáveis a entrada de cálcio se dá por um mecanismo no qual diminuição dos estoques intracelulares de Ca^{2+} é por uma estimulação constante, necessária para ativar a entrada de Ca^{2+} (BERRIDGE et al., 1997).

No retículo endo (sarco) plasmático a entrada de Ca^{2+} é catalisada pela Ca^{2+} -ATPase, que transloca 2 Ca^{2+} para cada ATP hidrolisado (DE MEIS e VIANNA, 1979). O efluxo de Ca^{2+} se dá por um canal estimulado por inositol trifosfato (IP_3) (BERRIDGE et al., 1993) e cafeína (receptor de rianodine) (SORRENTINO e VOLPE, 1993). A alta

afinidade da Ca^{2+} -ATPase ao cátion confere ao retículo um importante papel na regulação da concentração da Ca^{2+} livre do citosol.

A presença de uma outra organela que também está envolvida na homeostase de Ca^{2+} intracelular foi identificada em diferentes microorganismos. PHILOSOPH e ZILBERSTEIN, 1989 foram os primeiros a descrever a mobilização da Ca^{2+} em um compartimento intracelular através da nigericina em *Leishmania donovani*. Em 1994, VERCESI et al., identificaram pela primeira vez a presença de um compartimento ácido, sensível a nigericina em *Trypanosoma brucei* e o denominaram de acidocalcisoma. Posteriormente os acidocalcisomas foram encontrados em *T. cruzi* (DOCAMPO et al., 1995), *L. mexicana amazonensis* (LU et al., 1997), *Toxoplasma gondii* (MORENO e ZHONG, 1996) e recentemente em *Plasmodium chabaudi* e *P. falciparum* (PASSOS e GARCIA, 1998).

As características fisiológicas dos acidocalcisomas foram primeiramente descritas utilizando-se células permeabilizadas (VERCESI et al., 1994, DOCAMPO et al., 1995). A captação de Ca^{2+} ocorre em uma reação catalisada por uma Ca^{2+} -ATPase vacuolar em troca por H^+ à qual é inibida por vanadato. O gradiente de H^+ é formado por uma ATPase vacuolar sensível a bafilomicina A_1 . Um transporte de Cl^- , através de um canal de Cl^- , está associado à função da H^+ -ATPase vacuolar. A liberação de Ca^{2+} ocorre em troca de H^+ e é favorecida pela troca de Na^+/H^+ . Os acidocalcisomas são ricos em pirofosfato, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} . Nem todas estas bombas e trocadores estão necessariamente presentes em todos os acidocalcisomas descritos e sua composição interna pode variar.

Vacúolos ácidos contendo Ca^{2+} foram previamente descritos em *D. discoideum* (RONNEY e GROSS, 1992), muitos tripanossomatídeos (DOCAMPO et al., 1995) e em algumas células de mamíferos (THÉVENOD e SCHULTZ, 1988; THÉVENOD et al., 1989). Os vacúolos ácidos contendo Ca^{2+} identificados pela primeira vez em *C. parapsilosis* se assemelham aos vacúolos presentes na maioria dos tripanossomatídeos (DOCAMPO e MORENO, 1999) devido à ausência do Ca^{2+} -ATPase, V-H^+ -Ppase e do trocador Na^+/H^+ .

1.3.3- Proteínas desacopladoras

O gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_H^+$) construído pela respiração pode ser dissipado pela proteína desacopladora mitocondrial (STUART et al., 2000).

Estudos termogênicos em mitocôndrias de tecido adiposo marrom (BAT) revelam a existência de uma proteína de 32 kDa da membrana mitocondrial interna, responsável por estimular processos degradativos e consumo de O_2 sem síntese de ATP, gerando calor (NICHOLLS e FERGUSON, 2002-a). A UCP do BAT, posteriormente chamada de UCP1, quando estimulada pelo sistema nervoso simpático em adaptação ao frio, é capaz de provocar um aumento de condutância de prótons na membrana mitocondrial interna, permitindo a dissipação do $\Delta\mu_H^+$ e assim gerar calor (NICHOLLS e FERGUSON, 2002-a).

A UCP é ativa em mitocôndrias recém isoladas, porém a adição de nucleotídeos de purina (GDP, GTP, ADP, ATP) inibe sua atividade, reacoplando a respiração e a fosforilação oxidativa (NICHOLLS e FERGUSON, 2002-b). Estes nucleotídeos atuam como reguladores alostéricos do processo de termogênese. Além de ser inibida por nucleotídeos de purina, a UCP é ativada por ácidos graxos livres, que também participam do processo de termogênese (JEZEK et al., 1998).

Em 1995, a primeira evidência de uma proteína como UCP em plantas, PUMP (plant uncoupling protein) foi demonstrada em mitocôndrias de batata (Vercesi et al., 1995).

Assim, esta descoberta impulsionou a procura por UCPs em organismos mais simples, como amebas e fungos (JARMUSZKIEWCZ et al., 1999, JARMUSZKIEWCZ et al., 2000). A descrição da PUMP também incentivou a procura de UCPs em outros tecidos. Deste modo, foram descobertos genes que codificaram outras isoformas designadas UCP2, UCP3, BMCP e UCP4. A UCP2 é expressa em mitocôndrias de músculo esquelético e parece estar relacionada a termogênese muscular e ao peso corporal. A UCP4 e BMCP são expressas em cérebro e suas funções ainda são pouco conhecidas (SANCHIS et al., 1998; MAO et al., 1999). Estes sistemas dissipadores de energia apesar de agirem em diferentes níveis possuem o mesmo efeito final: diminuem a produção da síntese de ATP (JARMUSZKIEWCZ, 2002).

A existência de uma proteína tipo UCP na levedura *C. parapsilopsis* demonstra que a família das UCPs aparece também em alguns gêneros dentro do Reino Fungi mesmo que ausente em *Saccharomyces cerevisiae* (SLUSE e JARMUSZKIEWICZ, 2000).

1.3.3.1- Características estruturais da UCP

O transporte de metabólicos através da membrana mitocondrial interna é realizado por carreadores específicos que se encontram mergulhados na bicamada lipídica. A maioria destes carreadores transportam ânions (ADP, ATP, fosfato inorgânico, malato, etc.) que são necessários, não apenas a fosforilação oxidativa, mas também na integração de todas as vias metabólicas da célula. Todos estes carreadores pertencem à família de carreadores mitocondriais e possuem uma estrutura similar, com peso molecular por volta de 30 kDa (JARMUSZKIEWICZ, 2001).

A UCP possui 6 α -hélices transmembrana, sendo que ambas as extremidades, N- e C- terminais, se localizam do lado citosólico. O modelo também prevê dois *loops* hidrofílicos no espaço mitocondrial intermembrana e três do lado matricial (KLINGERBERG e APPEL, 1989).

1.3.3.2- Mecanismos de desacoplamento das UCPs

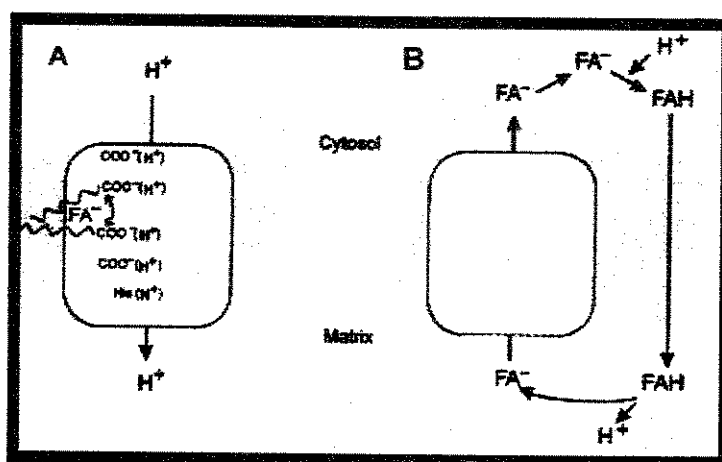


Figura 4- Dois possíveis mecanismos de ação da proteína desacopladora demonstrando o transporte de elétrons e a participação dos ácidos graxos (Jarmuszkiewicz, 2001).

Existem dois mecanismos que descrevem a recaptção de H^+ pela UCP. No primeiro modelo (figura 4. A) a UCP é o verdadeiro carreador de H^+ e os ácidos graxos não são translocados através da membrana. As UCPs permitem a passagem de prótons presentes no espaço intermembrana de volta para a matriz mitocondrial, contornando a ATP sintase e conseqüentemente dissipando o potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_H^+$). Segundo KLINGENBERG, a atividade da UCP é dependente da presença de ácidos graxos livres, e inibida por nucleotídeos de purina di- ou trifosfatados (HEATON et al., 1978; RIAL et al., 1983).

Um dos mecanismos de desacoplamento das UCPs propõe que os ácidos graxos livres (FFA-Free Fatty Acids) ligam-se a UCP e que os seus grupos carboxílicos funcionam como doadores de H^+ a resíduos protonáveis/deprotonáveis localizados no sítio da enzima (KLINGENBERG, 1990; WINKLER e KLINGENBERG, 1994). Neste modelo, FFA não são translocados através da membrana. Em 2001, ECHTAY, WINKLER e KLINGENBERG demonstraram que o transporte de prótons pelas UCPs 1, 2 e 3, necessita da presença de um cofator lipofílico, a ubiquinona (Q) na sua forma oxidada. O FFA ancorado na membrana mitocondrial, captaria um H^+ matricial, transferindo-o a ubiquinona através de uma ponte de hidrogênio. Este complexo FFAH-Q catalizaria a passagem do H^+ a um resíduo receptor da UCP que em seguida atravessaria a membrana por um mecanismo de transferência entre os resíduos protonáveis da enzima.

O segundo modelo proposto em 1991 por SKULACHEV, propõe que a UCP não seria um transportador de H^+ , mas sim um carreador de ânions de ácidos graxos para o exterior da mitocôndria, os quais atravessam a membrana mitocondrial na forma protonada, por um mecanismo de "flip-flop". O pH básico da matriz mitocondrial permite a dissociação do H^+ , dissipando assim o $\Delta\mu_H^+$ (Figura 4.B).

Seja qual for o verdadeiro mecanismo, é possível afirmar que a atividade da UCP diminui o percurso do gradiente de prótons formado pela cadeia respiratória.

1.3.4- Oxidase alternativa - AOX

As mitocôndrias de plantas e de alguns microrganismos possuem 2 sistemas dissipadores de energia: UCP que dissipa o $\Delta\mu_H^+$ e a AOX que dissipa a energia redox ao invés de construir o $\Delta\mu_H^+$ e pode ser usada para modular a produção de síntese de ATP

A respiração insensível ao cianeto foi observada pela primeira vez em 1929, por GENEVOIS, em brotos de ervilha, mas apenas no final dos anos 70, uma quinina oxidase insensível ao cianeto foi isolada a partir de mitocôndrias de *Arum maculatum* e a respiração resistente ao cianeto foi atribuída e esta enzima batizada de oxidase alternativa (AOX) (HUQ e PALMER, 1978; RICH, 1978). Com a criação de anticorpos monoclonais contra AOX de *Sauromatum guttatum*, a identificação de AOx foi possível, não só em uma grande variedade de plantas (DAY et al., 1995; SIEDOW e UMBACH, 1995), mas também em fungos (LAMBOWITZ et al., 1989), ameba (JARMUSZKIEWICZ et al., 1997) e em *C. parapsilosis* (MILANI et al., 2001).

A AOX retém elétrons da cadeia principal de transporte de elétrons ao nível da ubiquinona (Q)x. Quando a AOX é ativa, o fluxo de elétrons é desviado dos complexos III e IV, que são os ejetores de prótons (H^+), e o gradiente eletroquímico final de prótons é menor. A passagem de elétrons através da AOX pode ser especificamente inibida por vários compostos como ácidos hidroxâmicos (ácido benzohidroxâmico-BHAM, ácido salicilhidroxâmico-SHAM) (JARMUSZKIEWICZ et al., 2001).

A AOx em plantas, é estimulada por DTT e induzida por piruvato (JARMUSZKIEWICZ et al., 2001). Já em *C. parapsilosis* (levedura patogênica), *Neurospora crasa* e *Pichia stipitis* (fungos) a AOx é estimulada por GMP e inibida por LA.

(MILANI et al., 2001). Em *Acanthamoeba castellanii* (ameba) é também estimulada por GMP, mas é insensível ao LA (JARMUSZKIEWICZ et al., 2001).

Segundo HERLMORSHORST et al., 2002, em *C. albicans* ATCC 10231 a respiração de células crescidas na ausência de antimicina A foram insensíveis a SHAM

enquanto que a respiração das células crescidas na presença de antimicina A foi sensível a SHAM.

Embora da literatura seja possível extrair muitos estudos com diferentes gêneros e espécies de fungos, poucos são os relatos sobre avaliação destes microrganismos com potencial patogênico.

Deste modo, torna-se necessário, iniciar o trabalho em busca de informações básicas e extremamente importantes como tempo de geração e comportamento das curvas de crescimento de patógenos emergentes. Procedimentos de produção de esferoplastos e extração de mitocôndrias pertencem a segunda etapa, rumo ao conhecimento mais detalhado destes microrganismos.

2- OBJETIVOS

Em vista do que foi estabelecido até o momento este trabalho tem como objetivos:

- 1) estabelecer as curvas de crescimento em meio YEPD e YEPG para as leveduras: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, a fim de determinar o meio da fase exponencial para cada uma delas.
- 2) estabelecer o tempo de contato com as enzimas necessárias para a permeabilização das células de leveduras para obtenção de esferoplastos.
- 3) avaliar a presença de proteínas desacopladoras em *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 usando como controle a *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
- 4) utilizar os esferoplastos de leveduras para estudos de avaliação da bioenergética mitocondrial e transporte de Ca^{2+} e prótons em possíveis vacúolos ácidos buscando novos alvos para ação de drogas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MICRORGANISMOS AVALIADOS

Foram selecionadas para este estudo, cepas padrão *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112.

3.1.1- Manutenção das cepas

As cepas foram conservadas em água destilada estéril em frascos tipo penicilina, com tampa de borracha e lacre, à temperatura ambiente.

3.1.2- Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para confirmação de pureza das cepas, repiques, curvas de crescimento e obtenção de grandes quantidades de células foram: caldo infuso de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), Ágar Sabouraud dextrose (ASD) (SHIGEMATSU et al., 1982), YEPG (extrato de levedura 1%, glicerol 2% e bactopectona 2%) e YEPD (extrato de leveduras 1%, dextrose 2% bactopectona 2%) (CAMOUGRAND, 1987).

3.1.3- Reativação das cepas para estudo

Uma alíquota do frasco contendo microrganismo e água foi transferida para um tubo contendo caldo BHI e incubada a 37°C por 24h. Depois uma alíquota do crescimento obtido foi semeada em estrias em uma placa de ASD, incubando novamente a 37°C por 24h. Durante o estudo as cepas foram mantidas em ASD, a temperatura ambiente.

3.2- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS

3.2.1- Preparação do pré-inóculo

Foram realizados dois repiques do microrganismo em ASD com incubação de 24h a 37°C, para assim garantir a pureza e a viabilidade das amostras. Uma alçada do 2º. repique do microrganismo foi emulsionada em 50ml de meio de cultura (YEPD ou YEPG) incubando-se durante 24h a 37°C.

3.2.2- Preparação do inóculo

Após 24h de incubação do pré-inóculo, foram transferidos, em média, 10 ml para erlenmeyer contendo 600 ml de meio de cultura correspondente (YEPD ou YEPG). O inóculo foi então incubado, sob agitação, 200 rpm, a 37°C no Skaker pelo tempo determinado no item 3.2.4, necessário para que cada espécie atingisse sua fase exponencial de crescimento.

3.2.3- Obtenção das curvas de crescimento

O crescimento das leveduras foi avaliado pelo aumento da massa total de células em culturas realizadas nos meios líquidos YEPD e YEPG, monitorado por medidas de densidade óptica (DO). Aliquotas da cultura foram retiradas em determinados intervalos de tempo, medindo-se a absorbância em espectrofotômetro U-3000 com comprimento de onda de 530nm, utilizando meio de cultura como branco de reação.

3.2.4- Determinação do início da fase exponencial de crescimento e tempo de crescimento máximo

Os cálculos para determinação da equação da curva de crescimento, do início da fase exponencial e do tempo necessário para se alcançar a fase de crescimento máximo da fase exponencial, foram realizados pelo setor de Bioestatística da Faculdade de Ciências

Médicas-UNICAMP (EVERITT, 1999; LEITHOLD, 1982) com auxílio do programa computacional Microcal Origin versão 5.0 e Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA.

3.3- DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína das suspensões de células ou mitocôndrias isoladas foi determinada pelo método de biureto (GORNALL et al., 1949), modificado pela adição de 1% (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobrenitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.4- OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS DE LEVEDURAS

3.4.1- Enzimas

Para as espécies de *Candida* foi utilizada Liticase (L4025-Sigma) e para *Cryptococcus neoformans*, Lysing Enzymes (L1412-Sigma).

3.4.1.2- Curvas de permeabilização

A lise celular foi monitorada espectrofotometricamente a 530 nm em uma suspensão celular diluída em água (1:2000). Durante a permeabilização pela liticase para o gênero *Candida* e pela Lysing enzymes para o gênero *Cryptococcus*, a entrada de água nas células foi acompanhada através do inchamento destas células, que acarreta na diminuição da turbidez na suspensão celular, diminuindo a densidade óptica. Após a curva atingir um platô, a suspensão foi examinada em microscópio óptico comum observa-se que cerca de 90% das células eram convertidas em esferoplastos.

3.4.2- Preparação de esferoplastos do gênero *Candida*

As células de *Candida* obtidas no item 3.2.2 foram separadas do meio de cultura por sucessivas centrifugações a 3000 rpm. Na sequência foram lavadas com água gelada, seguida por uma lavagem com tampão A (1m sorbitol, 10mm MgCl₂ e 50mm Tris-HCl, pH 7,8). As células foram ressuspensa em tampão A (3ml/g de células) contendo 30mm de ditioneitol (DTT). Após 15 min de incubação sob agitação a 30°C, as células foram obtidas por centrifugação e ressuspensas em tampão A contendo liticase (1mg/g de células) e 1mm DTT e incubadas a 30°C. A digestão foi acompanhada em espectrofômetro até que aproximadamente 90% das células foram transformadas em esferoplastos. A reação foi bloqueada pela adição de tampão A gelado no mesmo volume e os esferoplastos, lavados duas vezes com o mesmo tampão (MILANI et al., 2000). A concentração de proteínas da suspensão final foi determinada pela técnica do biureto, conforme descrito em materiais e métodos.

3.4.2.1- Preparação de esferoplastos de *C. albicans* para Microscopia eletrônica

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia. Os esferoplastos de *C. albicans* foram lavados em 0.1 M Tampão de Na⁺ fosfato pH 7.4 com 2% sacarose em 200 g durante 5 min e fixados com Tampão glutaraldeído a 2,5% durante 2 horas a 4°C. Após lavagem em solução tampão, as células fixadas foram pós-fixadas em 1% OsO₄ durante 1 hora, acompanhadas por desidratação através de um gradiente de acetona a temperatura ambiente. O precipitado foi embebido em resina Epon. A partir do bloco de resina, foram realizados cortes ultrafinos (60-70 nm) submetidos à coloração com citrato e acetato de urranil e foram examinadas em microscópio de transmissão eletrônica LEO 906 (TEM), operado a 60 kV (Cassone et al., 1978; TRONCHIN et al., 1981; TRONCHIN et al., 1981 b).

3.4.2.2- Imunodeteção da UCP de *C. albicans* (CaUCP)

As proteínas totais extraídas dos esferoplastos de *C. albicans* foram separadas em gel de poliacrilamida a 10% (standard SDS-PAGE). As bandas das proteínas foram transferidas para uma membrana de nylon (Hybond-N) em um secador de gel (Pharmacia). A membrana foi bloqueada durante a noite em 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20 e 10% leite desnatado e incubada com anticorpo policlonal anti-AtPUMP1 (diluição 1:1000). Depois da incubação com conjugado fosfatase alcalina anti-rabbit IgG (diluição 1:5000), a membrana foi revelada no escuro em 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, e CSPD (diluição 1:2000) durante 5 min. As bandas foram visualizadas através da auto-radiografia e escaneadas através do sistema de documentação de foto Eagle-Eye photo (JARMUSZKIEWICZ et al., 1999).

3.4.3- Preparação de esferoplastos do gênero *Cryptococcus*

As células de *Cryptococcus neoformans* obtidas por centrifugação da cultura foram lavadas com água gelada, seguida por uma lavagem usando tampão SCS (20mM citrato de sódio, pH 5,8 e 1m sorbitol). As células obtidas por centrifugação foram ressuspensas em tampão SCS contendo Lysing Enzymes (20mg/g de células) e incubadas a 30°C. A digestão foi acompanhada em espectrofômetro até que aproximadamente 90% das células foram transformadas em esferoplastos. A reação foi bloqueada pela adição de tampão SCS gelado no mesmo volume e os esferoplastos lavados duas vezes com o mesmo tampão (VARMA et al., 1991 modificado). A concentração de proteínas da suspensão final foi determinada pela técnica do biureto, conforme descrito em materiais e métodos.

3.5- ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

A partir dos esferoplastos obtidos no item 3.7, o precipitado foi ressuspenso em tampão B1 (0,6m manitol, 1mm EGTA 0,5% BSA 1mm PMSF, 10mm tris-HCl, pH 7.4). Os esferoplastos foram mecanicamente rompidos utilizando-se homogeneizador Dounce. Os restos celulares foram precipitados por centrifugação (10min a 1000xg). As mitocôndrias foram precipitadas do sobrenadante por centrifugação de 10min a 10.500xg e

lavadas com tampão B2 (0,6m manitol, 1mm EDTA, 1% BSA, 10mm tris-HCl, pH 7.0). A presença do BSA no meio permite a quelação de ácido graxo livre da suspensão mitocondrial. A última lavagem foi realizada com meio B2 sem BSA e EDTA (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000). A concentração de proteínas da suspensão final foi determinada pela técnica de biureto conforme descrito em materiais e métodos.

3.6. AVALIAÇÕES METABÓLICAS

3.6.1- Meio de reação padrão

O meio de incubação padrão a 28°C contém: 125mM sacarose, 65mM KCl, 10mM Hepes pH 7.2, KH_2PO_4 (2,5mM) e 1mM MgCl_2 .

3.6.2- Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido polariograficamente por meio de um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instruments) em 1,3 mL de meio de incubação padrão a 28°C contendo: 125mM sacarose, 65mM KCl, 10mM Hepes pH 7.2, KH_2PO_4 (2,5mM) e 1mM MgCl_2 .

3.6.3- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial de membrana mitocondrial foi monitorado através da medida das alterações de fluorescência da safranina O (5 μM) utilizando o espectrofotômetro Hitachi modelo F4500, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm respectivamente (ÅKERMAN e WIKSTRÖM, 1976).

3.6.4- Atividade da bomba de prótons

A acidificação das células permeabilizadas (esferoplastos) foi monitorada através da medida das alterações de absorbância ou fluorescência da acridina orange, em espectrofotômetro modelo SLM Aminco DW 2000, nos comprimentos de onda de 493 e 530 nm ou um espectrofotômetro de fluorescência modelo Hitachi F4500 nos comprimentos de onda 510-550 nm (GORNALL, 1949).

4- RESULTADOS

Os resultados de cada experimento encontram-se agrupados por cepa estudada, a seguir.

4.1- CEPA DE *Candida albicans* ATCC 90028

4.1.1- Curvas de crescimento

As curvas de crescimento realizadas nos meios YEPD e YEPG, encontram-se respectivamente representadas nas figuras 5 e 6. Os dados brutos que deram origem às curvas, podem ser visualizados nos anexos 1 e 2.

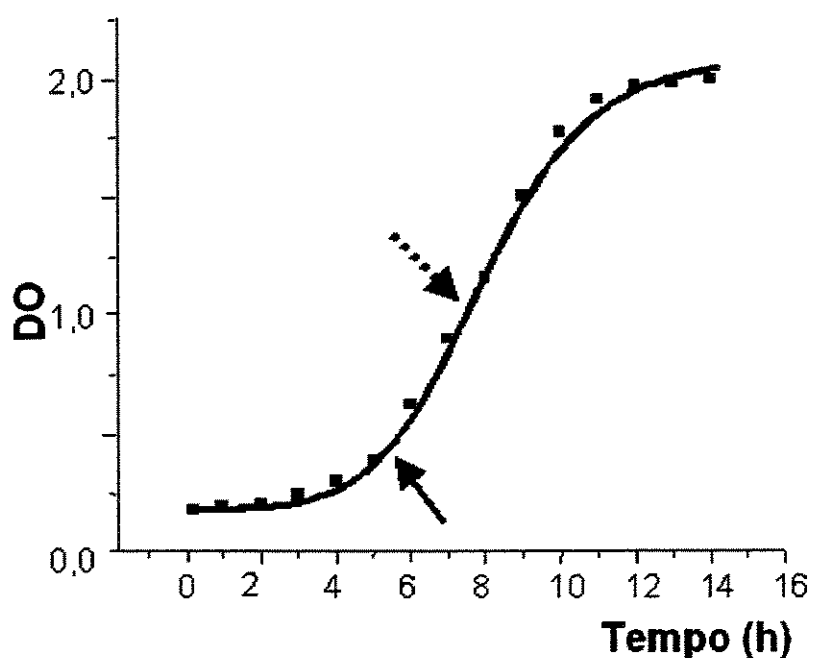


Figura 5- Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 90028 em meio YEPD. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 5:12h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 7:35h.

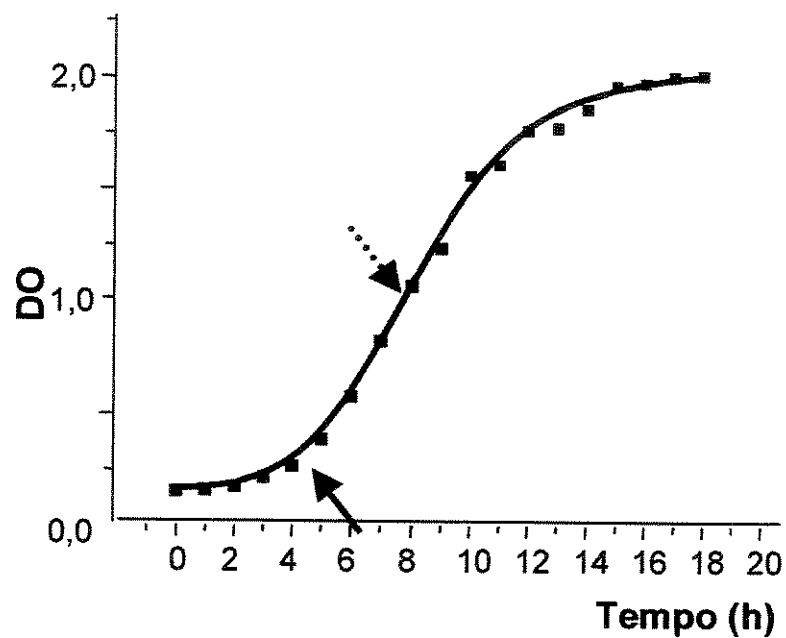


Figura 6- Curva de crescimento de *Candida albicans* ATCC 90028 em meio YEPG. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 4:05h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 7:58h.

4.1.2- Curvas de permeabilização

As curvas de permeabilização realizadas com células obtidas nos meios YEPD e YEPG estão representadas, respectivamente, nas figuras 7 e 8.

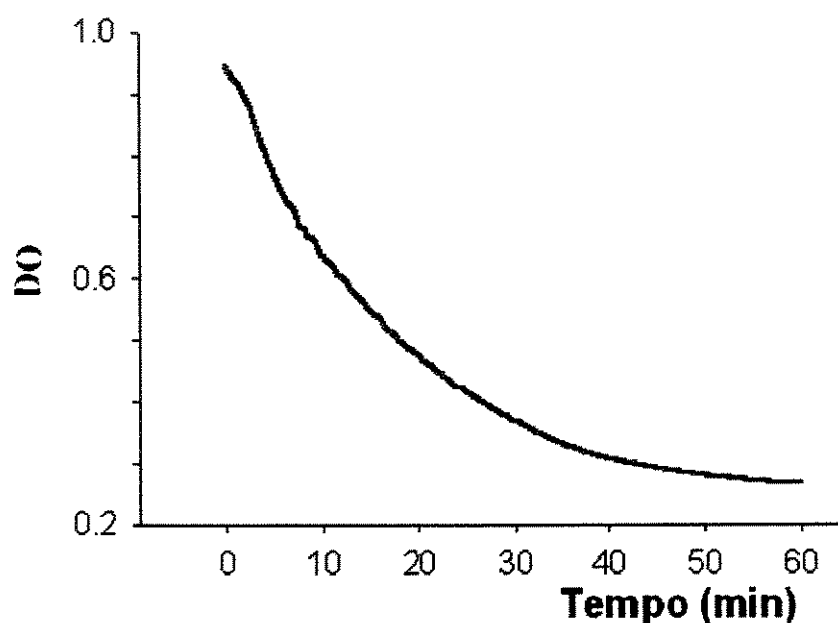


Figura 7- Curva de permeabilização de células de *C. albicans* ATCC 90028 obtida por crescimento em meio YEPD com a enzima liticase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 60min. A leitura da DO foi realizada em 530 nm.

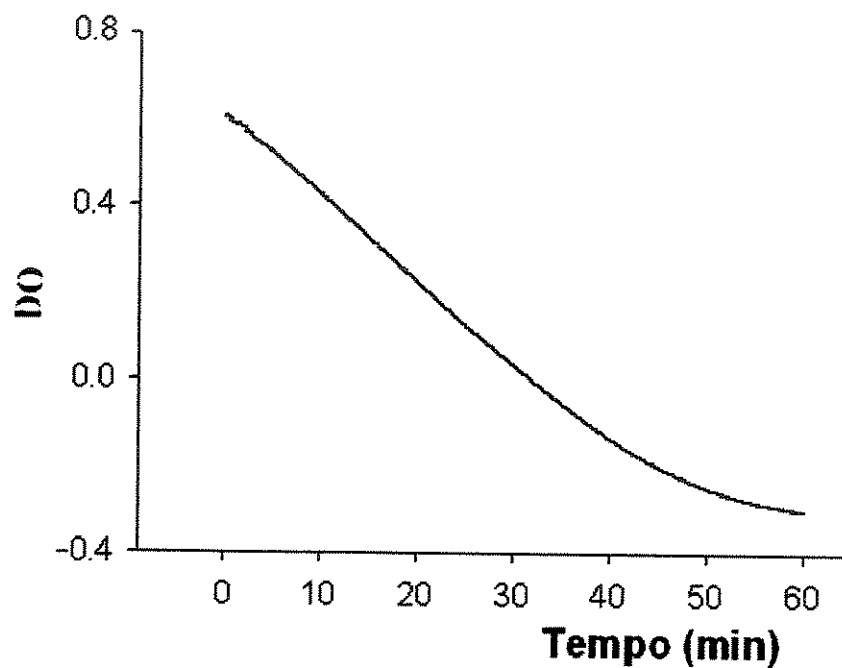


Figura 8- Curva de permeabilização de células de *C. albicans* ATCC 90028, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 60min. As leituras de DO foram realizadas em 530 nm.

4.1.3- Microscopia eletrônica de células e esferoplastos de *C. albicans*

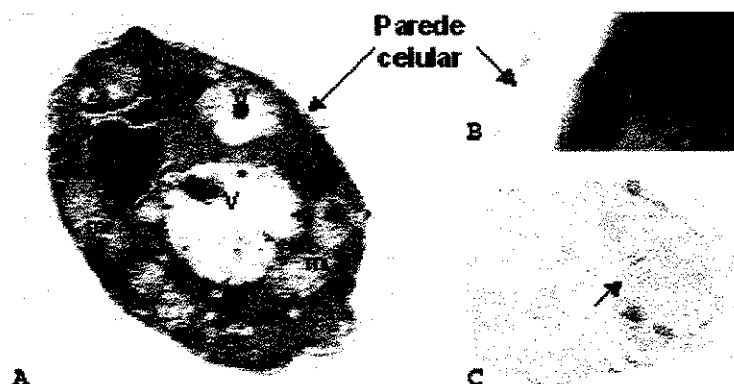


Figura 9- Microscopia eletrônica de célula de *C. albicans* ATCC 90028. A fotografia A (aumento de 24000X) é de uma célula após 8h de crescimento em meio de cultura líquido YEPG onde observamos a parede celular intacta, núcleo (N), vacúolos (V) e mitocôndrias (M). Em B observamos a parede celular aderida à membrana plasmática e em C, a seta aponta as cristas de uma mitocôndria.

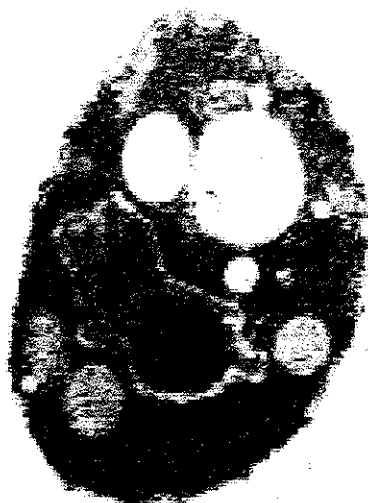


Figura 10- Microscopia eletrônica de esferoplasto de *C. albicans* ATCC 90028. Após 60 min de contato com a enzima litase, observa-se ausência quase total da parede celular, porém, na parte direita inferior da figura é possível visualizar restos de parede celular (aumento de 30000X).

4.1.4- Experimentos realizados em esferoplastos de *C. albicans* obtidos a partir de crescimento de células em meio YEPG

4.1.4.1- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e respiração celular

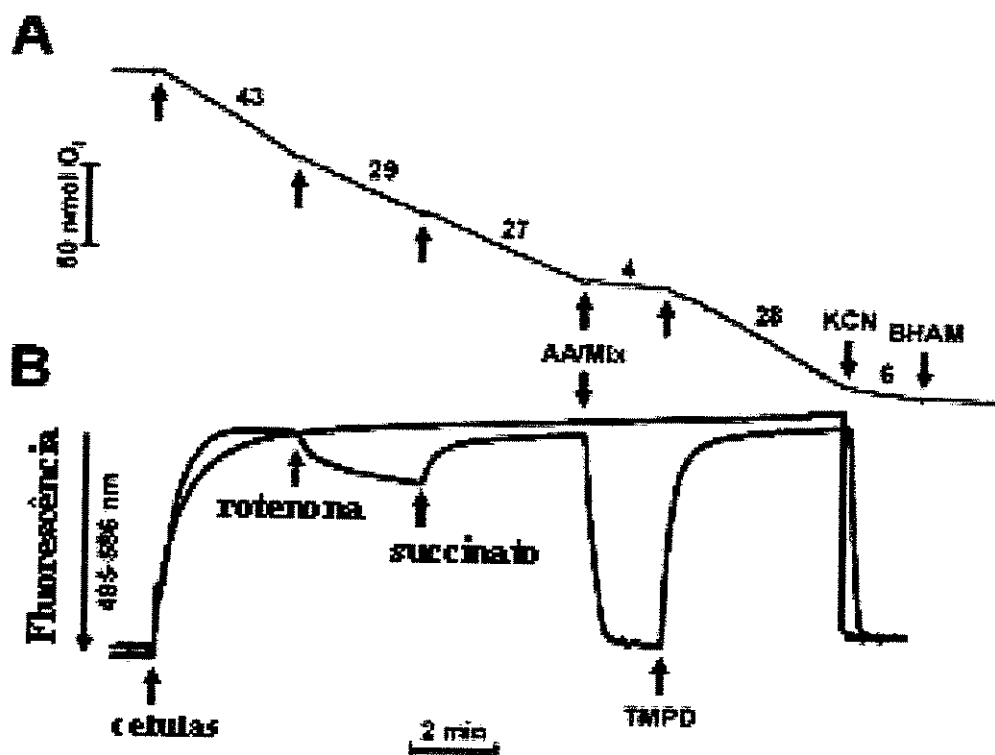


Figura 11- Efeito de vários substratos e inibidores no consumo de oxigênio (A) e no potencial de membrana mitocondrial (B) em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028. Os esferoplastos de *C. albicans* (1mg/ml) foram incubados em meio de reação contendo 125 mM sacarose, 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM P_i , 1 mM $MgCl_2$, 65 mM KCl e 5 mM cocktail (malato, glutamato, piruvato, e α -cetoglutarato) e 5 μ M safranina O. As adições dos substratos 5 mM succinato e TMPD/ascorbato e dos inibidores 4 μ M rotenona, 2 μ M antimicina A (AA) e/ou 2 μ M mixotiazol (Mix), 1 mM KCN e 2 mM BHAM estão indicados pelas setas. Os números nos traçados indicam a velocidade no consumo de O_2 em $O_2/\text{min}/\text{mg}$.

4.1.4.2- Avaliação do efeito de adições de ATP e BSA

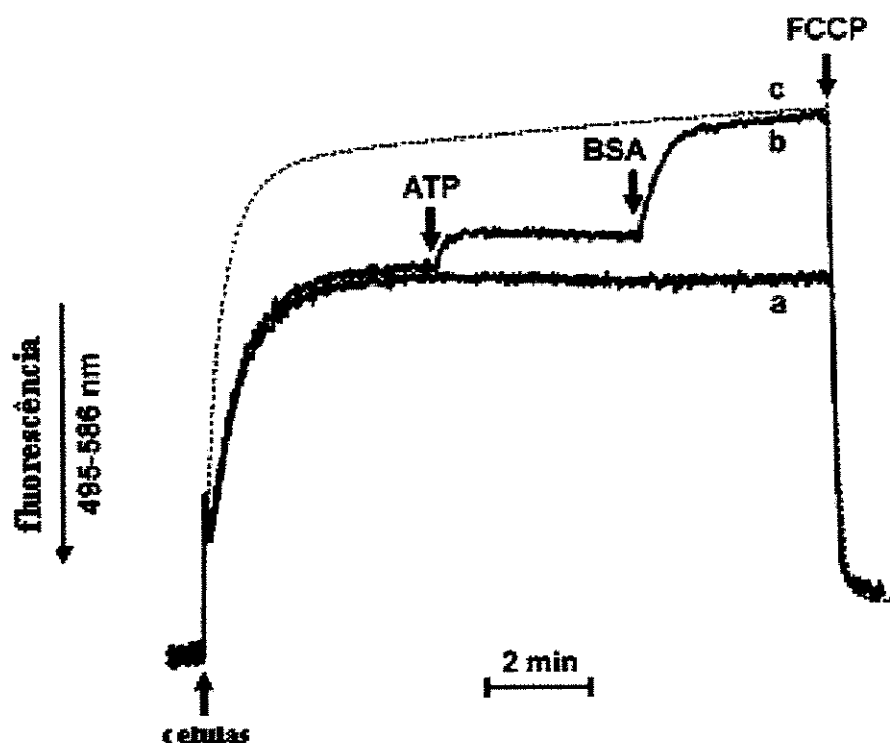


Figura 12- Efeito de 5 mM ATP e 0,5% BSA no $\Delta\Psi$ mitocondrial em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028 na presença de 1 μ M CAT utilizando a metodologia da safranina O. Os esferoplastos (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 5 mM de substrato coquetel e 5 μ M safranina O (linha b). A linha (a) é o controle sem a presença de BSA e a linha (c) é o controle com ATP e BSA presentes desde o início do experimento.

4.1.4.3- Avaliação do efeito da adição de LA e BSA

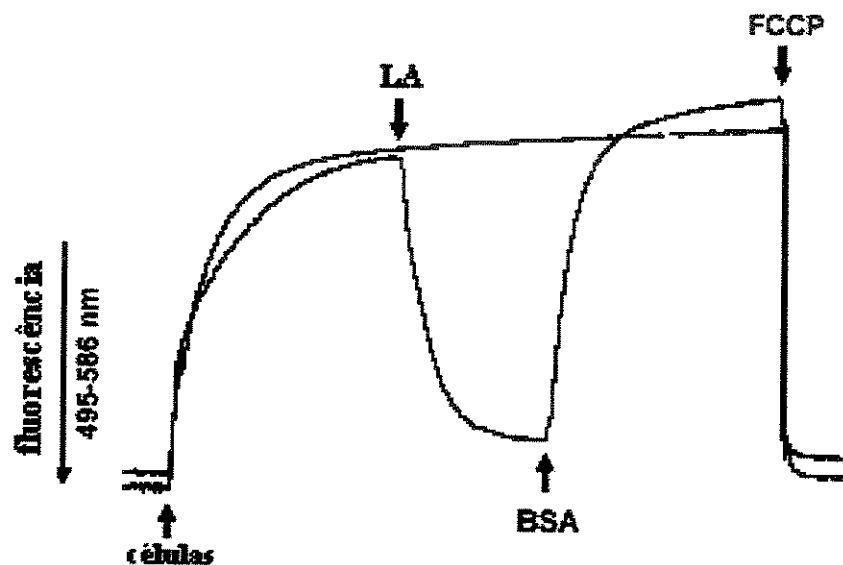


Figura 13- Diminuição no potencial de membrana em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028 induzido pelo ácido linoleico. Os esferoplastos de *C. albicans* (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 5 mM de substrato coquetel e 5 μ M safranina O (linha a). Na linha (b) 10 μ M LA e 0,5% BSA foram adicionados no local indicado pelas setas.

4.1.4.4- Avaliação do efeito da adição de ADP

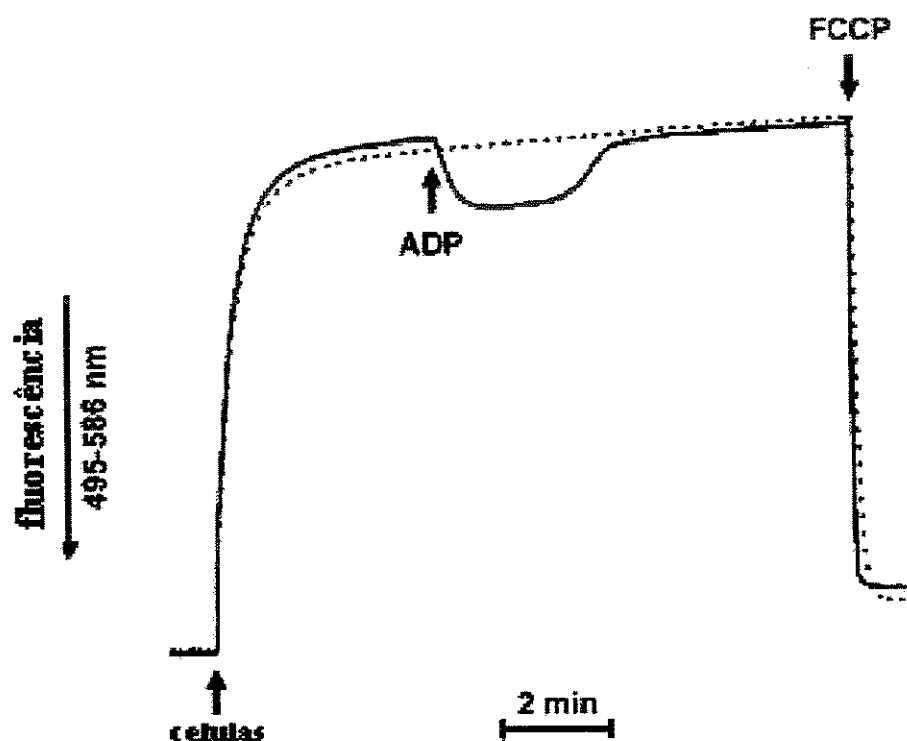


Figura 14- Fosforilação do ADP em mitocôndrias de esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028. Os esferoplastos (1mg/ml) foram incubados em meio de reação contendo 5 mM substrato coquetel, 0,05% BSA e 5 μ M safranina O. Os esferoplastos, 200 μ M ADP e 1 μ M FCCP foram adicionados e estão indicados pelas setas. A linha tracejada representa o experimento controle sem a adição do ADP.

4.1.4.5- Avaliação do efeito da adição de vanadato e da nigericina

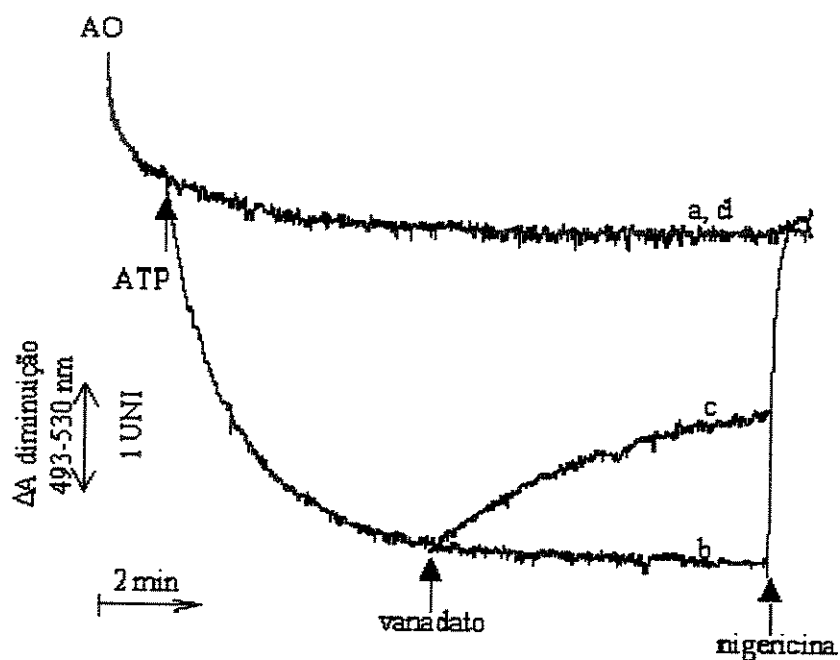


Figura 15- Acúmulo de acridine orange dirigido por ATP em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028. Os esferoplastos (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 2 μ M antimicina A ou 2 μ M mixotiazol, 2 μ g/ml oligomicina e 1 mM EGTA. A acridine orange (3.3 μ M) foi adicionada 3 minutos após as células. A linha (a) não possui ATP, linha (b) com 0,5 mM ATP, linha (c) possui ATP e 50 μ M vanadato foram adicionados no local indicado pela seta e a linha (d) com ATP e vanadato desde o início do experimento.

4.1.4.6- Avaliação do efeito da adição de Ca^{2+} e da nigericina

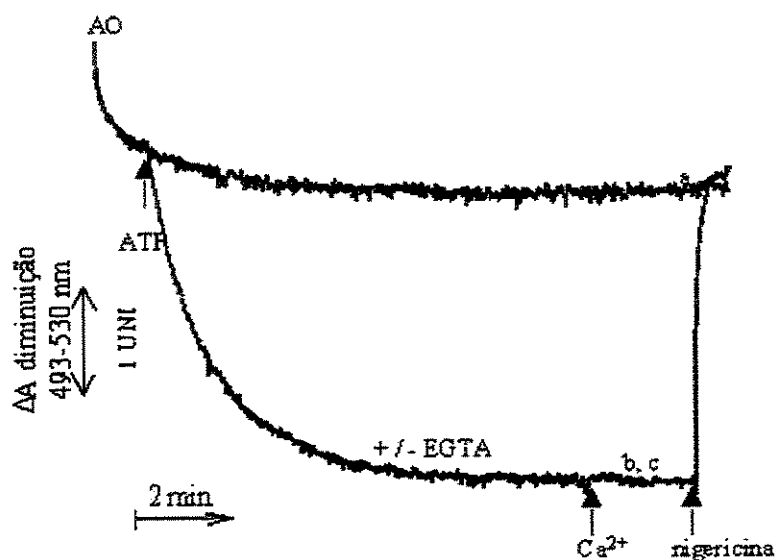


Figura 16- Acúmulo de acridine orange dirigida por ATP em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028. Os esferoplastos (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 2 μM antimicina A ou 2 μM mixotiazol, 2 $\mu\text{g/ml}$ oligomicina e 1 mM EGTA. A acridine orange (3,3 μM) foi adicionada 3 minutos após as células. A linha (a) não possui ATP, a linha (b) possui 0.5 mM ATP e a linha (c) possui ATP e 50 mM Ca^{2+} ou 2 μM bafilomicina foram adicionados nos locais indicados pelas setas.

4.1.5- Experimento realizado em mitocôndrias isoladas de células *C. albicans* ATCC 90028 obtidas por crescimento em meio YEPG

4.1.5.1- Avaliação do efeito do LA na fosforilação oxidativa

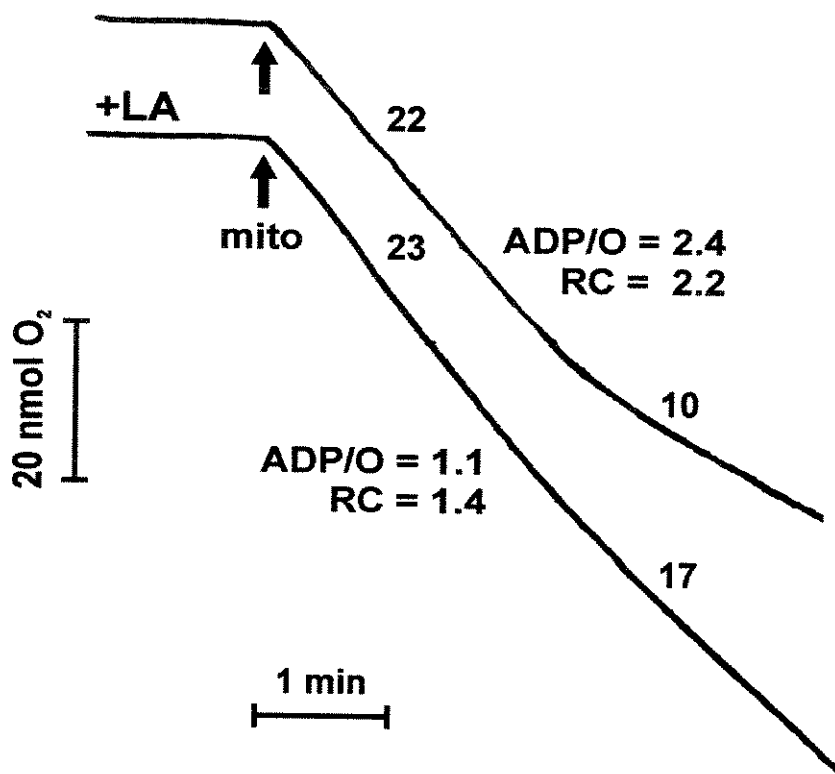


Figura 17- Efeito do LA na fosforilação oxidativa. As mitocôndrias de *C. albicans* ATCC 90028 (1 mg/ml) foram adicionadas em 1,3 ml de meio de reação padrão (28°C) com 5 mM de substrato coquetel na ausência ou presença de 2 μM LA (+LA). A adição de 200 μM ADP é indicada pela seta (ADP). Os números nos traços indicam a velocidade no consumo de O_2 em O/min/mg.

4.1.6- Imunodeteccção de UCP

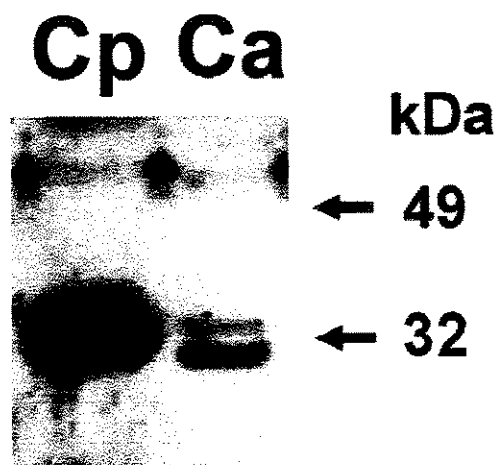


Figura 18- Imunodeteccção da proteína desacopladora de *C.albicans* ATCC 90028 com anticorpo polyclonal contra PUMP1 de *Arabidopsis*. É possível a visualização de 2 bandas na faixa Ca. As células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Cp), foram usadas como controle positivo. Os pesos moleculares estão indicados pelas setas (32 e 49 kDa).

4.2- CEPA DE *C. krusei* ATCC 6258

4.2.1- Curvas de crescimento

As curvas de crescimento realizadas nos meios YEPD e YEPG, encontram-se respectivamente representadas nas figuras 19 e 20. Os dados brutos que deram origem às curvas, podem ser visualizados nos anexos 3 e 4.

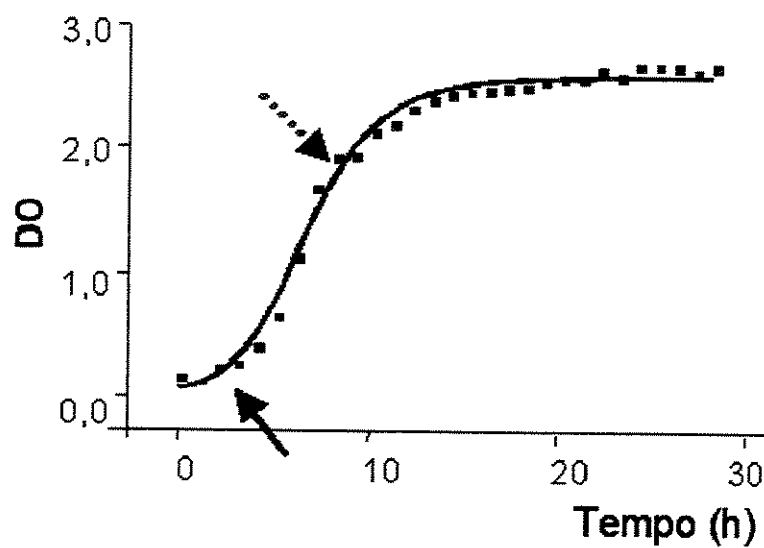


Figura 19- Curva de crescimento de *Candida krusei* ATCC 6258 em meio YEPD. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 1:34h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 6:52h.

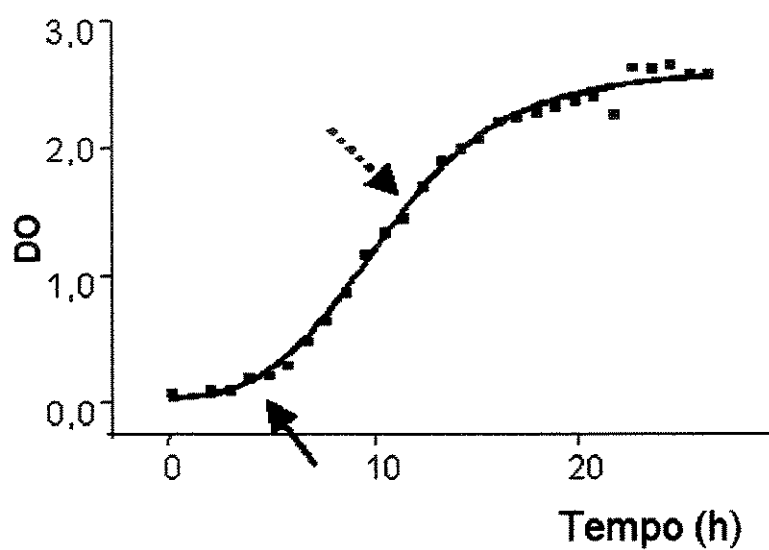


Figura 20- Curva de crescimento de *Candida krusei* ATCC 6258 em meio YEPG. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 3:16h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 11:09h.

4.2.2- Curvas de permeabilização

As curvas de permeabilização realizadas com células obtidas nos meios YEPD e YEPG estão representadas, respectivamente, nas figuras 21 e 22.

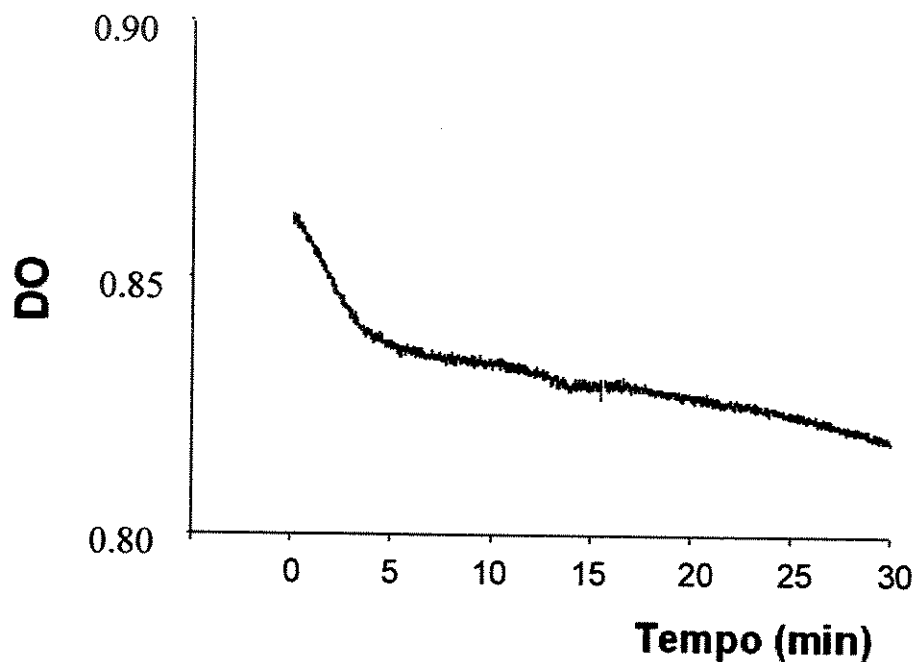


Figura 21- Curva de permeabilização de células de *C. krusei* ATCC 6258, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima liticase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 30min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

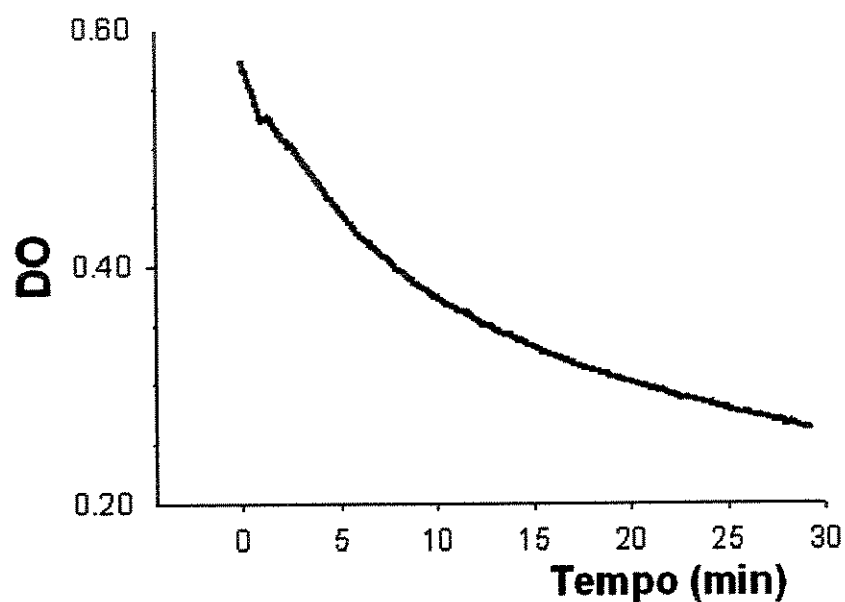


Figura 22- Curva de permeabilização de células de *C. krusei* ATCC 6258, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis foi de 30min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

4.2.3- Experimentos realizados em esferoplastos de células de *C. krusei* ATCC 6258 obtidas por crescimento em meio YEPD

4.2.3.1- Avaliação do efeito da adição de ADP

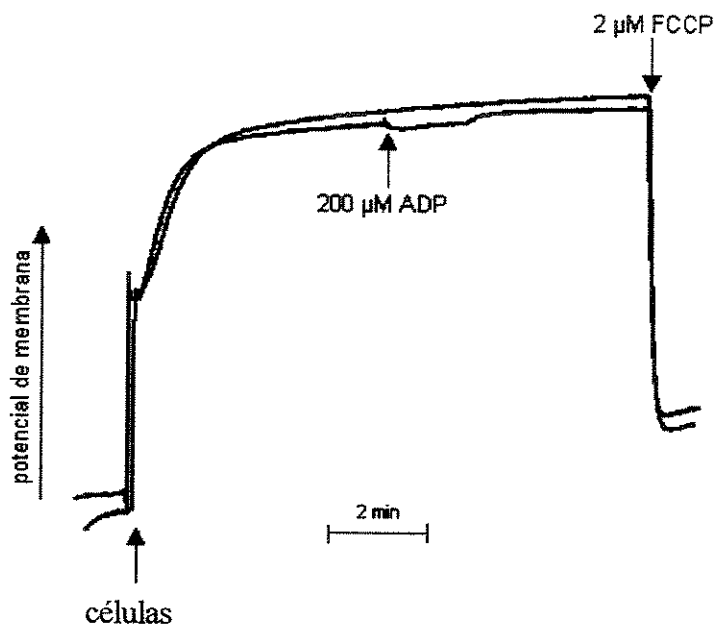


Figura 23- Efeito do ADP no potencial de membrana em esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258 evidenciado com safranina O. Os esferoplastos de *C. krusei* (mg/ml) foram adicionados em meio de reação (125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.2, 2,5 mM P_i e 1 mM $MgCl_2$) contendo 5 mM substrato cocktail (5 mM piruvato, malato, α -cetoglutarato e glutamato), 0,5 mM ATP, 0,05% BSA e 10 µM de safranina O. A linha (a) é o controle sem adição de 200 µM ADP.

4.2.3.2- Avaliação do efeito da adição de ATP e BSA.

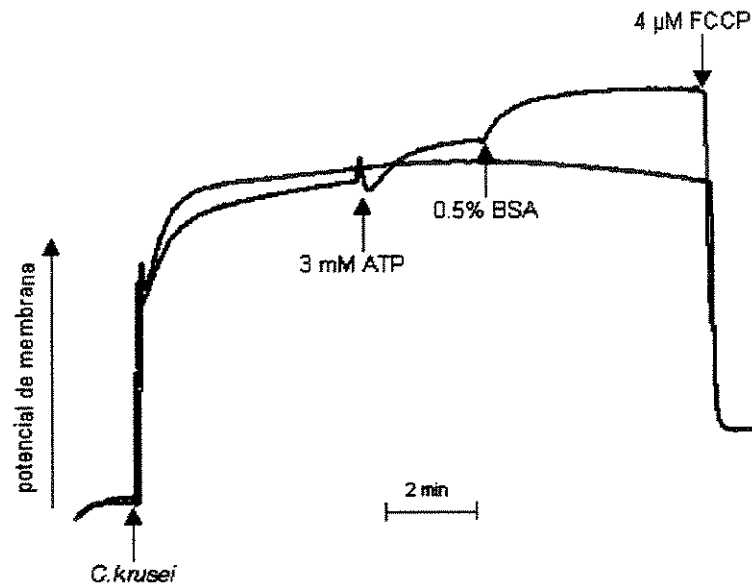


Figura 24- Efeito do ATP e BSA no potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258 na presença de 1 μM de carboxyatractilosídeo (CAT). Os esferoplastos de *C. krusei* (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação mencionado na figura anterior contendo 5 mM cocktail e 10 μM de safranina O. A linha (a) é o controle sem adição de ATP e BSA.

4.2.3.3- Avaliação de efeito da adição de LA e BSA

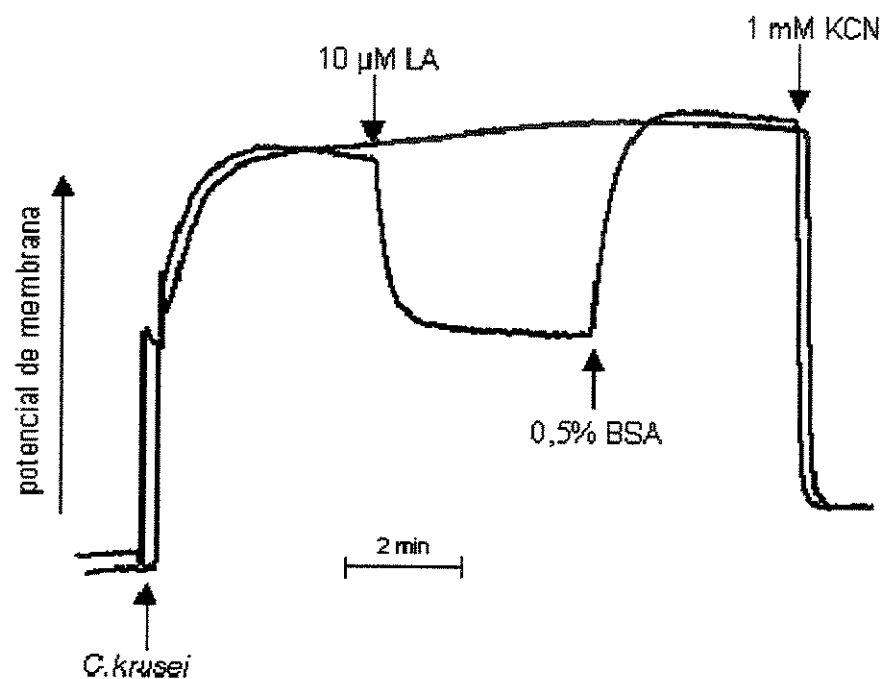


Figura 25- Diminuição no potencial de membrana em esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258 induzido pelo ácido linoleico (LA). Os esferoplastos de *C. krusei* (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação mencionado na figura 23 contendo 5 mM cocktail e 10 μM de safranina. A linha (a) é o controle sem adição de LA e BSA.

4.2.3.4- Avaliação do efeito da adição de nigericina e bafilomicina

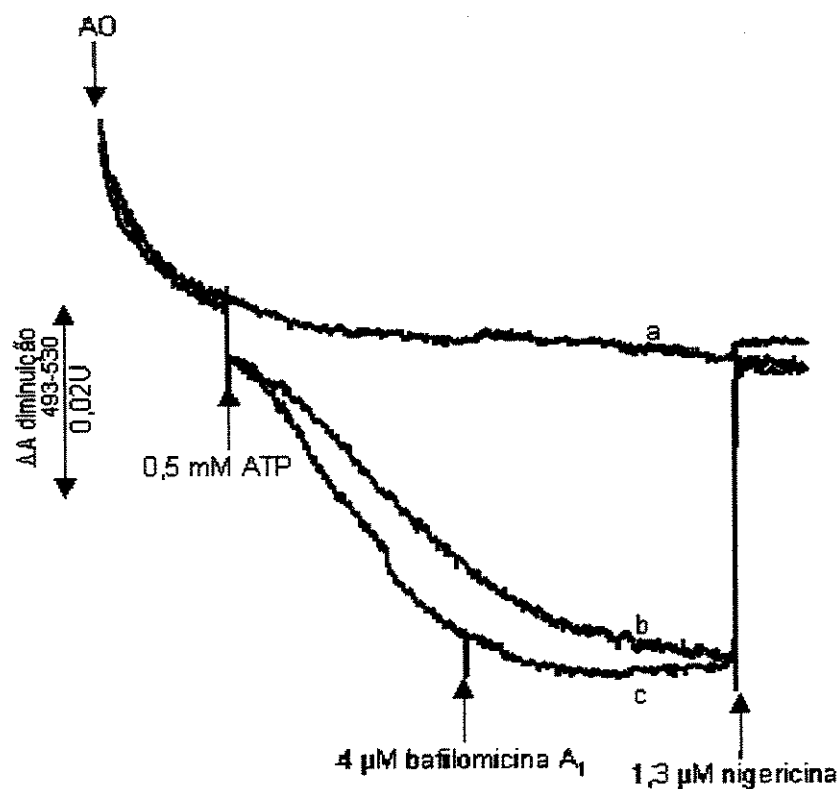


Figura 26- Acidificação vacuolar dependente de ATP em esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258 pelo efeito da nigericina e da bafilomicina. Os esferoplastos de *C. krusei* (1 mg/ml) foi adicionados em meio de reação contendo 2 μM de antimicina A (AA), 2 μg/ml de oligomicina, 1 mM EGTA, 0,05 mM de ATP e 3,3 μM de acridina orange. A linha (a) não possui ATP, as linhas (b) e (c) possuem ATP.

4.2.3.5- Avaliação do efeito da adição de nigericina e vanadato

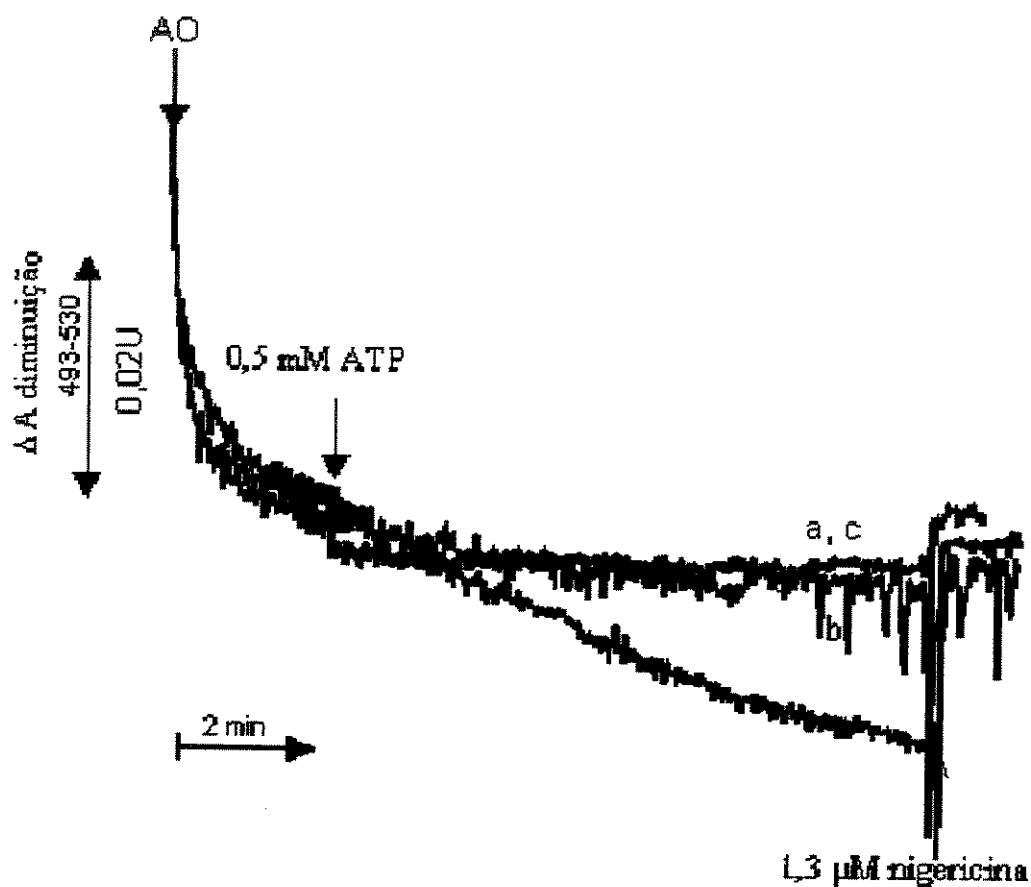


Figura 27- Acidificação vacuolar dependente de ATP em esferoplastos de *C. krusei*: ATCC 6258 pelo efeito da nigericina e do vanadato. Os esferoplastos de *C. krusei* (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 2 µM de AA, 2 µg/ml de oligomicina, 1 mM EGTA e 3,3 µM de acridine orange. A linha (a) não possui ATP, a linha (c) possui 0,05 mM ATP e a linha (b) possui ATP e 0,5 mM de vanadato desde o início do experimento.

4.2.3.6- Avaliação do efeito da adição de Ca^{2+} e nigericina

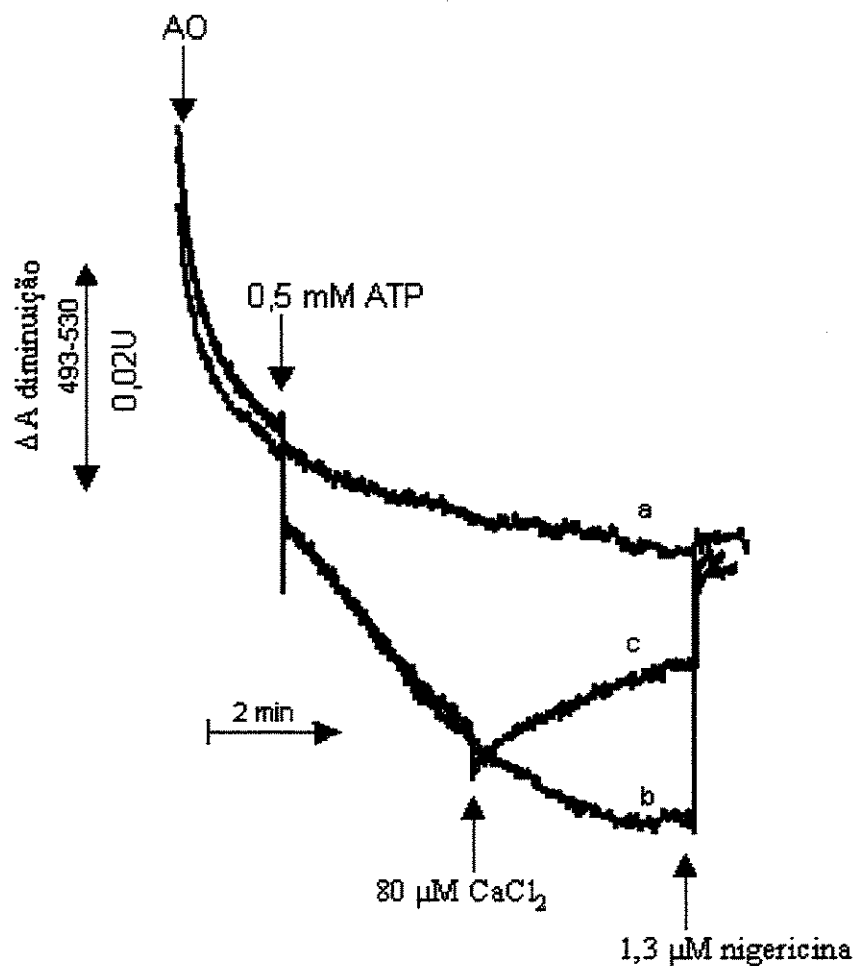


Figura 28- Liberação da acridine orange do compartimento ácido induzida por Ca^{2+} em esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258. Os esferoplastos de *C. krusei* (1 mg/ml) foram adicionados em meio de reação padrão contendo 2 μM de AA, 2 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina, 1 mM EGTA e 3,3 μM de acridine orange. A linha (a) não possui ATP, a linha (b) e (c) possuem ATP.

4.3- CEPA DE *Candida parapsilosis* ATCC 22019

4.3.1- Curvas de crescimento

As curvas de crescimento realizadas nos meios YEPD e YEPG, encontram-se respectivamente representadas nas figuras 29 e 30. Os dados brutos que deram origem às curvas, podem ser visualizados nos anexos 5 e 6.

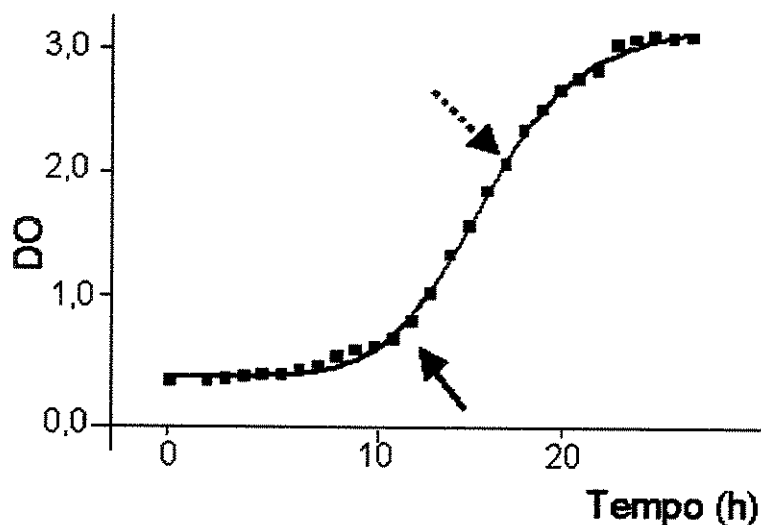


Figura 29- Curva de crescimento de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em meio YEPD.

A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 11:42h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 17:05h.

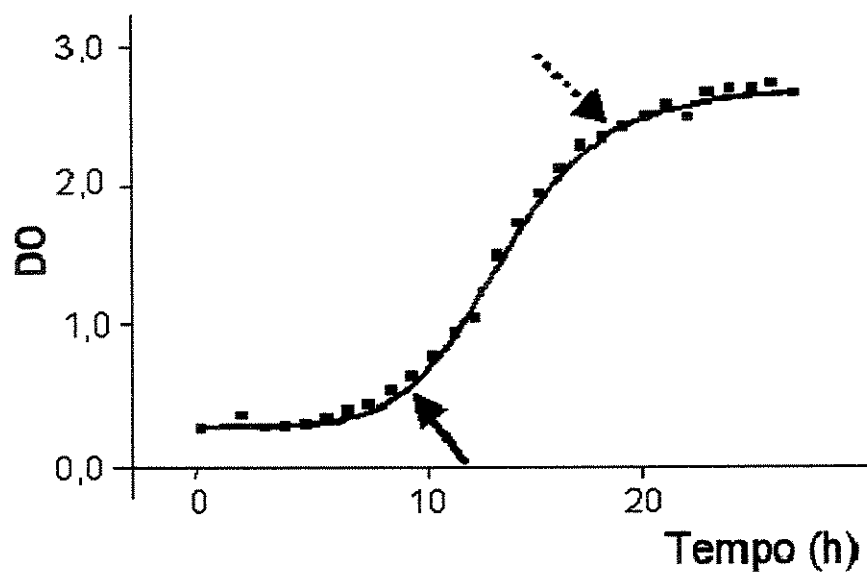


Figura 30- Curva de crescimento de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em meio YEPG. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 8:54h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 18:31h.

4.3.2-Curvas de permeabilização

As curvas de permeabilização realizadas com células obtidas nos meios YEPD e YEPG estão representadas, respectivamente, nas figuras 31 e 32.

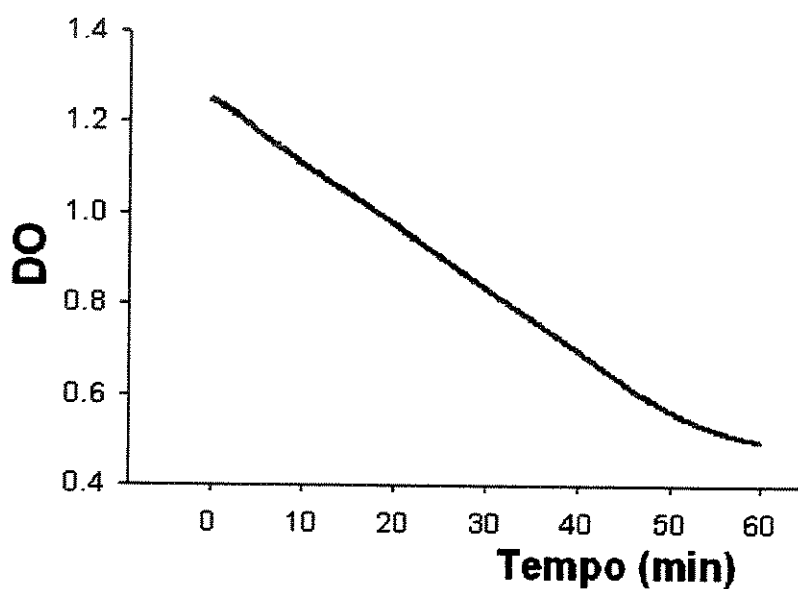


Figura 31- Curva de permeabilização de células de *C. parapsilosis* ATCC 22019, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima lítase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 60min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

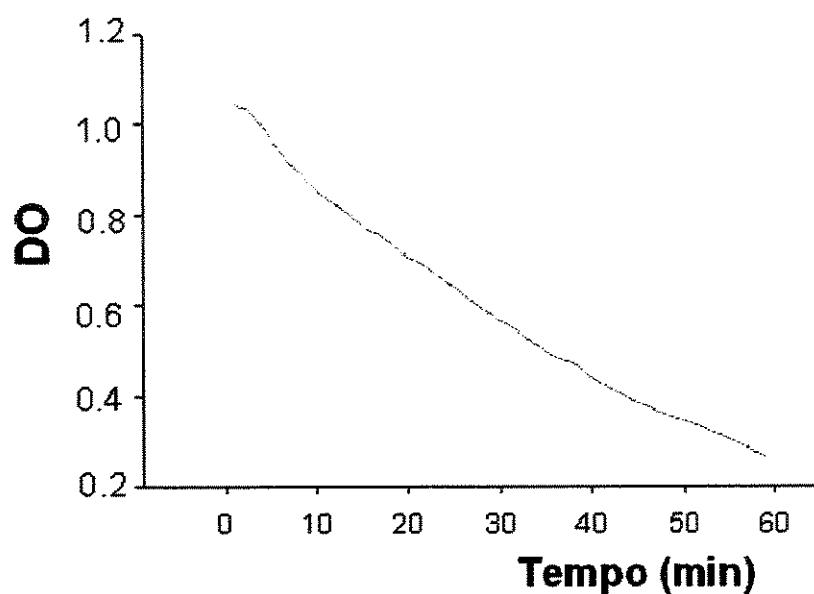


Figura 32- Curva de permeabilização de células de *C. parapsilosis* ATCC 22019, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima liticase. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 60min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

4.4- CEPA DE *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112

4.4.1- Curvas de crescimento

As curvas de crescimento realizadas nos meios YEPD e YEPG, encontram-se respectivamente representadas nas figuras 33 e 34. Os dados brutos que deram origem às curvas, podem ser visualizados nos anexos 7 e 8.

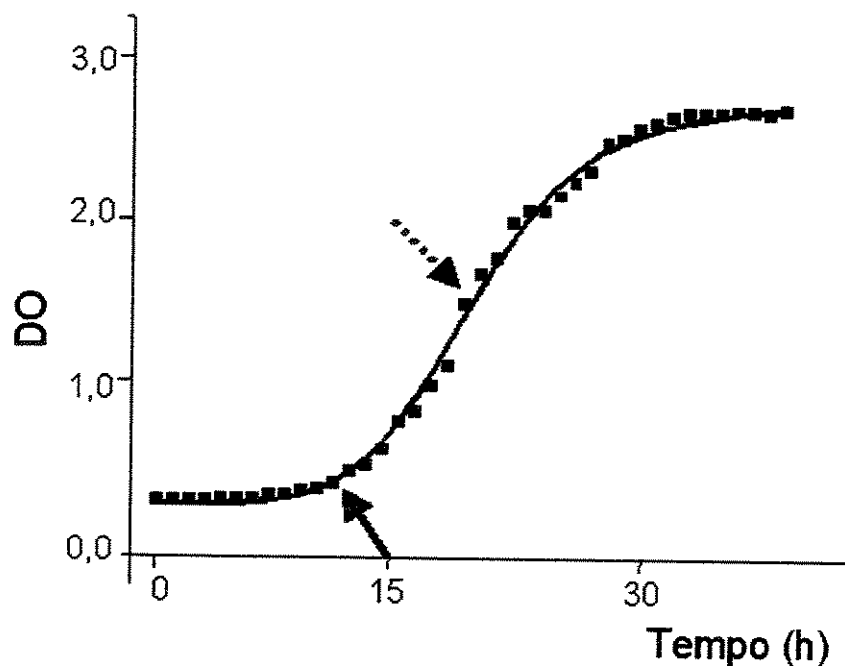


Figura 33- Curva de crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 em meio YEPD. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 11:44h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 19:21h.

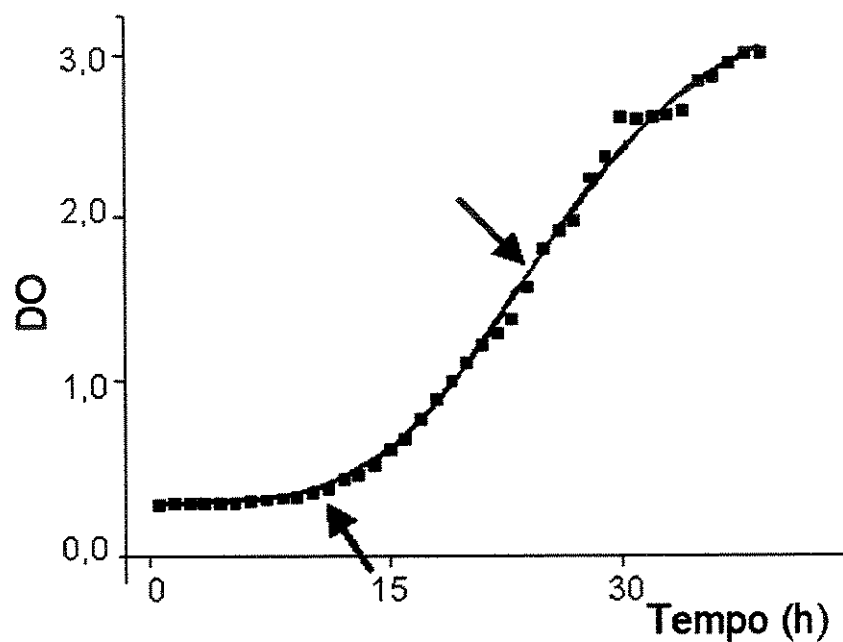


Figura 34- Curva de crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 em meio YEPG. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 10:46h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 24:22h.

4.4.2- Curvas de permeabilização

As curvas de permeabilização realizadas com células obtidas nos meios YEPD e YEPG estão representadas, respectivamente, nas figuras 35 e 36.

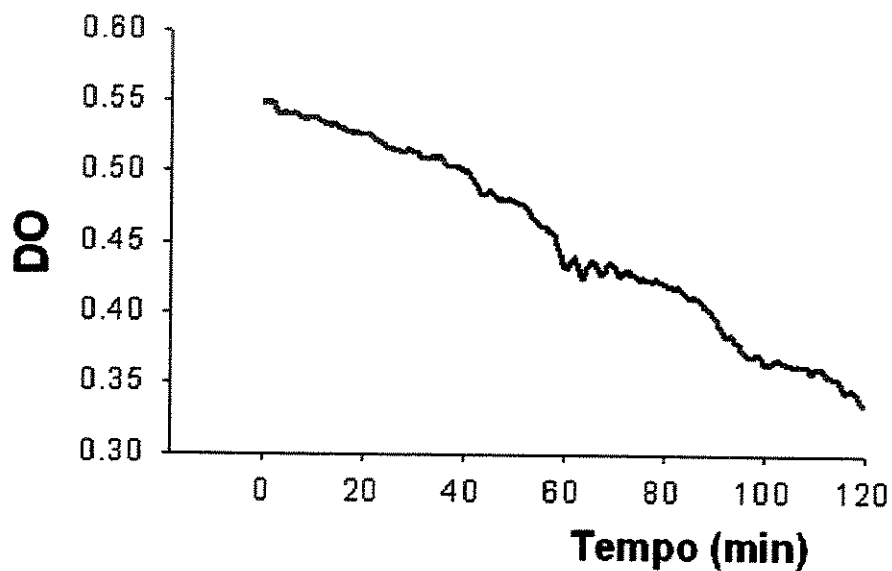


Figura 35- Curva de permeabilização de células de *C. neoformans* ATCC 90112, obtidas por crescimento em meio YEPD, com a enzima Lysing enzymes. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 120min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

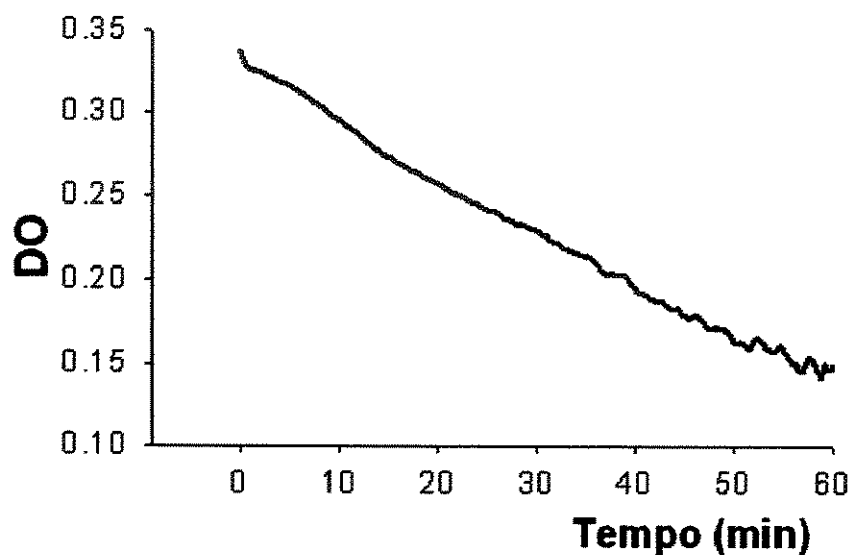


Figura 36- Curva de permeabilização de células de *C. neoformans* ATCC 90112, obtidas por crescimento em meio YEPG, com a enzima Lysing enzymes. O tempo necessário para que 90% das células estejam permeáveis é de 60min. As leituras de DO foram realizadas a 530 nm.

5- DISCUSSÃO

Não há dados disponíveis na literatura sobre curvas de crescimento das cepas de leveduras selecionadas para este estudo, nem tampouco dados sobre seu desenvolvimento nos meios de cultura indicados para proliferação de células para estudos metabólicos.

Sabe-se que os microrganismos, de maneira geral, reproduzem-se através de uma curva de crescimento onde podemos destacar diferentes fases: fase *lag* ou adaptativa, onde o microrganismo se adapta ao meio de cultura e inicia-se a produção de metabólitos para o seu desenvolvimento; a segunda fase é a exponencial ou logarítmica, onde a população está em total atividade metabólica, na qual a multiplicação das células ocorre rapidamente; na fase estacionária, ou 3ª fase, o número de células permanece constante pela escassez de nutrientes e, por fim, a última fase é a de declínio, que é caracterizada pela morte celular (BARBOSA et al., 1999).

Experimentos realizados em esferoplastos e mitocôndrias de *C. albicans* ATCC 10261 em 1978 relataram apenas que as leveduras eram coletadas após 48 horas de crescimento (SHEPHERD et al., 1978). Em 1982, foram realizados experimentos em mitocôndrias de *C. albicans* 7N, a qual foi isolada de um paciente com Candidíase pulmonar, avaliou o efeito do antifúngico cetoconazol. O crescimento das células era realizado em meio de cultura líquido suplementado com glicose e estas células eram crescidas durante 16 horas (SHIGEMATSU et al., 1982) e não se mencionava fases de crescimento. Em 1987, Camougrand et al., compararam os resultados obtidos com células de *C. parapsilosis* CBS 7154 provenientes de dois meios de cultura suplementados respectivamente com dextrose e com glicerol. Observaram que em células obtidas após crescimento em meio com dextrose, apenas 27% de ATP era produzido pela respiração celular enquanto que nas células crescidas em meio suplementado com glicerol, 100% de ATP era produzido pela respiração celular. Em 2001, Milani et al., relatam estudos com células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 na metade da fase exponencial em meio YEPG, sem no entanto, especificar tempo de obtenção destas células.

Diante desta falta de subsídios, foi necessário construirmos curvas de crescimento para as diferentes espécies de leveduras selecionadas. As curvas foram construídas comparativamente, a partir de crescimento celular em meios de cultura líquidos suplementados com dextrose (YEPD) e glicerol (YEPG). Para cada espécie, foi

determinado o início da fase exponencial de crescimento e ponto de maior atividade metabólica.

As curvas de crescimento para as espécies *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, nos dois meios de cultura, estão representadas nas figuras 5, 6, 19, 20, 29, 30, 33, 34, onde puderam ser acompanhadas até a fase estacionária (3 leituras de DO muito próximas). A fase de declínio não pode ser evidenciada através da metodologia de cultura em meio líquido, pois, apesar da morte das células, estas permanecem no meio de cultura e, conseqüentemente, as leituras de densidade óptica mantêm-se constantes.

O início da fase exponencial e o tempo de crescimento máximo para as diferentes espécies variaram de acordo com os meios de cultura. Células de *C. albicans* ATCC 90028 obtidas em YEPD possuem início de fase exponencial após 5:12h de incubação e em YEPG após 4:05h. Existe também, uma pequena diferença quando comparamos o tempo de crescimento máximo para estas células, em YEPD este horário se dá aos 7:35h de incubação e em YEPG é após 7:58h. As células de *C. krusei* ATCC 6258, obtidas tanto em YEPD quanto em YEPG possuem o mais precoce início de fase exponencial dentre todas as espécies estudadas, o que, em tempo de incubação, corresponde, respectivamente, a 1:34h e 3:16h. O tempo de crescimento máximo em YEPD é muito menor quando comparado ao meio YEPG, 6:52h no primeiro e 11:09h no segundo. Por sua vez, para a cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019, crescimento em meio YEPD propicia o início da fase exponencial em 11:42h e, em meio YEPG, este início é muito mais rápido, correspondendo a 8:54h. O tempo de crescimento máximo da fase exponencial em meio YEPD difere por 1:26h, a menos, do que o necessário para YEPG, que é de 17:05h contra 18:31h em YEPD.

Para o gênero *Cryptococcus*, o crescimento em YEPD ou YEPG propicia inícios muito próximos de fase exponencial, 11:44h e 10:46h de incubação. Por outro lado, o tempo de crescimento máximo em YEPD corresponde a 19:21h enquanto que em YEPG corresponde a 24:22h. O início de fase exponencial acontece primeiro em YEPG, enquanto que o tempo de crescimento máximo se dá primeiro em YEPD.

Inúmeras foram as tentativas em permeabilizar as células de *C. krusei* ATCC 6258 crescidas em YEPD ou YEPG seguindo o protocolo proposto por MILANI et al., 2001-b, onde as células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 eram crescidas durante 16h.

Após a finalização das curvas de crescimento foi possível certificar que os tempos para atingir as diferentes fases das curvas de crescimento, variam de acordo com as espécies e os meios de cultura, não sendo possível uma generalização, nem mesmo em se tratando de espécies do mesmo gênero.

A liticase é a enzima utilizada para digerir a parede celular das espécies de *Candida*, tornando-as permeáveis aos substratos (MILANI et al., 2001-b). O tempo necessário para a permeabilização destas células pode variar de uma espécie para outra, mas para uma mesma espécie, independe do meio de obtenção das células, desde que todas estejam em fase exponencial. Células de *C. albicans* ATCC 90028 (figuras 7 e 8) e de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (figuras 31 e 32), obtidas tanto em YEPD quanto em YEPG, necessitam de 60 minutos de contato com a enzima para que 90% das células sejam convertidas em esferoplastos. Para células de *C. krusei* ATCC 6258 (figuras 21 e 22), este tempo é reduzido pela metade, em apenas 30 minutos, 90% destas células tornaram-se esferoplastos.

Para o gênero *Cryptococcus*, foi necessária utilização de um complexo enzimático (celulase, protease e chitinase) para obtenção de esferoplastos, denominado comercialmente Lysing Enzymes® Sigma (VARMA et al., 1991). A obtenção de esferoplastos somente foi possível após uma adaptação do protocolo de VARMA et al., 1991, para extração de DNA. Efeito satisfatório foi atingido após duplicação da quantidade de enzima em relação à quantidade de proteína. Para as células de *Cryptococcus neoformans* cepa ATCC 90112, ao contrário do observado para as cepas do gênero *Candida*, o tempo de contato com a enzima variou de acordo com o meio de obtenção das células, sendo de 120 min para o crescimento em meio YEPD e 60 min para as provenientes de YEPG.

As variações de tempo de contato necessário para a ação adequada das diferentes enzimas frente as diferentes cepas avaliadas, provavelmente estejam relacionadas com diferenças de concentração dos componentes da parede celular de cada levedura, onde a cepa de *Cryptococcus neoformans* ainda agrega um fator complicador que é a presença de cápsula mucopolissacarídica.

A caracterização da bioenergética mitocondrial em *C. albicans* ATCC 90028 foi realizada seguindo a metodologia previamente utilizada em *C. parapsilosis* (MILANI, G. et al., 2001). As leveduras foram crescidas em meio de cultura líquido, YEPG, até a metade da fase exponencial de sua curva de crescimento. Para que fosse possível a comprovação visual da permeabilização, células de *C. albicans* ATCC 90018, foram fotografadas antes e depois da ação da liticase. Na figura 9 é possível observar uma célula intacta com parede celular íntegra (PC), núcleo (N), vacúolo (V) e as mitocôndrias (M).

Os esferoplastos foram preparados utilizando a liticase para digerir sua parede celular e se tornaram permeáveis a substratos e inibidores mitocondriais, onde a integridade mitocondrial celular destes esferoplastos foi mantida. Na figura 10, após a ação da liticase, foi possível observar a ausência quase total da parede celular, com apenas pequenos pedaços de parede ao lado direito da figura. Na figura C as cristas mitocondriais são bem nítidas, confirmando sua integridade.

A atividade nas mitocôndrias desta levedura foi investigada: Foi possível detectar a presença de uma proteína desacopladora e caracterizar a cadeia respiratória clássica e sua habilidade em sustentar o $\Delta\Psi$ oxidando diferentes substratos respiratórios. A figura 11 mostrou que a mitocôndria *in situ* em esferoplastos de *C. albicans* ATCC 90028, em meio de reação com substratos ligados ao NAD, formaram e mantiveram estável o potencial de membrana mitocondrial. A subsequente adição da rotenona diminuiu a atividade do Complexo I aproximadamente em 30% na respiração e no $\Delta\Psi$. Isto sugere uma significativa contribuição do Complexo I para a formação do $\Delta\Psi$ de acordo com os resultados obtidos por Helmerhorst, et al., 2002, que encontraram em *C. albicans* ATCC 10231 um Complexo I sensível a rotenona e uma bomba de próton similar a oxidoredutase NADH-Q. A adição de 5 mM succinato restaurou o $\Delta\Psi$ mas o nível de consumo de O_2

permaneceu inalterado ou diminuiu muito pouco, provavelmente devido ao aumento no $\Delta\Psi$ e ou possivelmente para a regulação negativa da cadeia insensível ao CN^- . (CAMOUGRAND, N., 1986). O Complexo III foi bloqueado pela antimicina A (AA) ou mixotiazol que promoveram o colapso no $\Delta\Psi$ e reduziu a respiração em mais de 90%. A velocidade respiratória e o $\Delta\Psi$ foram restaurados pela adição do TMPD/ascorbato. Finalmente, a inibição do Complexo IV por 1mM KCN foi acompanhada pela diminuição completa do $\Delta\Psi$ e a velocidade de respiração diminuiu cerca de 85%. A mudança drástica no $\Delta\Psi$ depois da inibição do Complexo II e IV sugere seu essencial papel na conservação de energia pelas mitocôndrias de *C. albicans*. A respiração insensível a CN^- foi inibida por 2 mM BHAM, sugerindo a presença da oxidase alternativa, como previamente descrita (MILANI et al., 2001; HELMERHORST et al., 2002). Helmerhorst et al., reportaram que a respiração pelas células de *C. albicans* ATCC 10231 foi insensível a SHAM enquanto que a respiração das células crescidas na presença de AA foi completamente inibida por 5 mM SHAM, indicando que somente a cadeia alternativa foi utilizada (HELMERHORST et al., 2002).

Uma proteína desacopladora, outro sistema dissipador de energia que pode também modular o $\Delta\Psi$ e a velocidade respiratória foi recentemente identificada no Reino Fungi através da CpUCP de *C. parapsilosis* (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000), mas em *Saccharomyces cerevisiae* a UCP não existe (ELMOUALIJ et al., 1997). Na figura 18, a existência de uma CaUCP, homóloga a da CpUCP foi também detectada em mitocôndrias de *C. albicans* ATCC 90028, através de análises de “imunoblot” utilizando anticorpos anti-AtPUMP1 (HANÁK et al., 2001). A análise revelou a existência de duas bandas em *C. albicans*, sugerindo a presença de mais de uma UCP como ocorre em mamíferos e plantas (ELMOUALIJ, B., 1997; HUH et al., 2001). A única banda detectada em proteína total em células de *C. parapsilosis* (coluna Cp) foi usada como controle positivo na figura 18. As proteínas desacopladoras são geralmente ativadas por FFAs e inibidas por ATP (ŽÁČKOVÁ et al., 2002; JABŮREK et al., 1999; JEZEK et al., 1998). Consequentemente, as medidas do $\Delta\Psi$ em mitocôndrias *in situ* de *C. albicans* após consecutivas adições de ATP e BSA aumentam consecutivamente, por causa da ligação com FFAs conforme

descrito na figura 12. A linha tracejada (c) demonstra formação do $\Delta\Psi$ pelas mitocôndrias *in situ* na presença de ATP e BSA desde o início do experimento.

Em experimentos com mitocôndrias isoladas, de *Candida albicans* (figura 17 A), a razão ADP/O diminuiu de 2.4 para 1.1 na presença de 2 μM LA uma vez que a respiração no estado 4 foi estimulada cerca de 75% na figura 17 B quando comparada com a figura A. Os resultados mostram que a ciclo de H^+ induzido pelo LA pode eficientemente desviar a energia da fosforilação oxidativa no estado 3 da respiração se a velocidade respiratória no estado 3 não é modificada. Estes experimentos foram realizados na presença de 1 μM de CAT para evitar que o carreador ADP/ATP contribuisse para a recaptção de H^+ induzida por FFA através do translocador de FFA (SCHULACHEV, V.P. 1998).

A presença de glutamato, piruvato e malato/ α -cetoglutarato, também impedem o transporte de ácidos graxos através de carreadores correspondentes (SCHULACHEV, V.P. 1998). Desta maneira, a observação do desacoplamento da fosforilação oxidativa causada pelo LA pode ser atribuída à CaUCP. A figura 14 demonstra que, na presença de ATP e BSA, as mitocôndrias *in situ* de *C. albicans* são eficientemente fosforiladoras.

Foi verificada também a presença de um vacúolo ácido em esferoplastos de *C. albicans*, onde a acidificação é dirigida por ATP. A adição do vanadato (figura 15) foi capaz de liberar parte do H^+ acumulado enquanto que a bafilomicina ou o CaCl_2 adicionado no experimento demonstrado na figura 16 não causaram nenhuma diferença nesta acidificação vacuolar.

A presença de uma proteína descopladora em espécies de *Candida* significa seu possível papel no metabolismo de energia mitocondrial e proteção celular contra a produção excessiva de ROS. Este papel protetor contra ROS foi descrito para UCP2 e UCP3 (MATTIASSON et al., 2003).

A presença em *C. albicans* de uma cadeia alternativa de transferência de elétrons (HELMERHORST, E.J., et al., 2002) e de uma oxidase alternativa (JARMUSZKIEWICZ et al., 1997), ambas ausentes em células de mamíferos, levanta a hipótese de alvos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. Por sua vez, a

inibição seletiva da proteína desacopladora, poderia levar ao aumento da produção de ROS e conseqüente morte celular, evidenciando talvez, a existência de um alvo adicional para o desenvolvimento de drogas.

As mitocôndrias dos esferoplastos de *C. krusei* foram estudadas *in situ*. A formação do $\Delta\Psi$ através do método da safranina O observado na figura 14 (ADP) mostrou que as células estavam permeáveis e as mitocôndrias *in situ* foram capaz de fosforilar o ADP. O $\Delta\Psi$ formado por estas mitocôndrias na presença de CAT, um inibidor do carreador ADP/ATP, na figura 12 aumentou aditivamente após a adição de ATP e BSA, um inibidor da proteína desacopladora e um quelante de ácidos graxos respectivamente. A adição de LA no experimento que pode ser observado na figura 13 diminui o $\Delta\Psi$ na presença de CAT e foi restabelecido após a adição de BSA. Estes resultados sugerem a presença de uma proteína desacopladora.

Nos esferoplastos de *C. krusei* ATCC 6258, foi evidenciado a presença de um vacúolo ácido através das figuras 26, 27, 28. Demonstrou-se que a acidificação vacuolar dependente de ATP é acompanhada pela mudança de espectro na fluorescência da AO. Os inibidores mitocondriais utilizados como a AA, mixotiazol e oligomicina mostraram que a mitocôndria não está envolvida nesta acidificação. A adição da bafilomicina, um inibidor da H^+ ATPase, observado na figura 26 não causou nenhuma mudança na acidificação vacuolar enquanto que o ortovanadato, verificado na figura 27, inibiu totalmente esta acidificação. Na figura 28, pode-se observar que adicionar-se $CaCl_2$ houve liberação parcial do H^+ acumulado, indicando a presença de um trocador Ca^{2+}/H^+ . O possível papel fisiológico para o transporte de Ca^{2+} e H^+ poderia ser na regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico e a regulação do pH citosólico pode ser muito importante em muitas situações fisiológicas (MILANI et al., 2001).

Ao iniciar-se a investigação de um possível compartimento ácido que acumula Ca^{2+} , o ácidocalcisoma, a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 começou a apresentar características macro e micromorfológicas variadas em cada um dos repiques subseqüentes. Após o seu crescimento, em meio de cultura líquido, a curva de permeabilização também se apresentou de forma diferente e também não foi possível repetir e confirmar resultados obtidos anteriormente.

Contatos foram feitos com outros laboratórios que possuíam esta espécie para controle de qualidade, mas estes também relataram o mesmo tipo de problemas com esta cepa. Desta forma, contra a nossa vontade, foi necessário interromper os estudos com esta cepa, ou ficaram restritos aos que já haviam sido terminados. Passamos então para a caracterização da bioenergética em *C. albicans* ATCC 90028. Iniciamos também alguns experimentos com o *Cryptococcus neoformans*, mas a ausência da Lysing enzymes impossibilitou a continuação do trabalho.

Na realidade, este trabalho, pode ser considerado um piloto, para futuros trabalhos com leveduras patogênicas ou outros patógenos fúngicos emergentes. A partir dos dados aqui relatados, há muito a explorar em relação as cepas de *C. krusei*, *C. parapsilosis* e, em especial para *C. neoformans*, para o qual foi realizada apenas a parte basal. Até mesmo para *Candida albicans*, para a qual a literatura oferece mais relatos, ainda cabem muitas interrogações.

Ainda serão necessários muitos esforços para um melhor conhecimento destes e de outros patógenos humanos, até que se possa, de maneira mais segura e definitiva, conseguir debelar, de forma menos agressiva para o hospedeiro, as infecções da atualidade.

6- CONCLUSÃO

Avaliando os dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

Foram estabelecidas as curvas de crescimento em meio YEPD e YEPG para as leveduras *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, com a determinação dos tempos necessários para início da fase exponencial e para obtenção do crescimento máximo para cada uma delas.

Foi possível observar que os tempos necessários para atingir as diferentes fases de crescimento variam de acordo com a espécie e o meio de cultura, não havendo padronização para gênero ou espécie quando relaciona-se estas leveduras com os meios de cultura YEPD e YEPG.

O tempo de contato das células com a enzima, para a obtenção de esferoplastos, pode variar entre espécies de um mesmo gênero.

Não foram observadas diferenças nos tempos para obtenção de esferoplastos a partir de células da mesma espécie do gênero *Candida* provenientes dos dois meios de cultura avaliados.

Células de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 apresentaram necessidade de diferentes tempos de contato com a enzima no processo de permeabilização, na dependência do meio de cultura utilizado para o seu crescimento.

As mitocôndrias *in situ* e isoladas de *C. albicans* ATCC 90028 são capazes de fosforilar o ADP. Na presença de CAT, o $\Delta\Psi$ formado em mitocôndria *in situ* aumentou aditivamente após a adição de ATP e BSA e o LA diminuiu o $\Delta\Psi$ que depois foi restabelecido por BSA. O LA em mitocôndrias isoladas aumentou o estado 4 durante a fosforilação oxidativa. Estes resultados sugeriram a presença de uma proteína desacopladora que foi confirmada por imunodeteção.

É possível sugerir a presença de proteínas desacopladoras nas cepas de *Candida krusei* ATCC 6258. Mais experimentos são necessários para a confirmação da existência de mais de uma.

Pode-se relatar a presença de vacúolo ácido nas células de *Candida albicans* ATCC 90028 e sugerir sua presença nas células de *Candida krusei* ATCC 6258.

A cepa de *C. albicans* ATCC 90028 também possui um P-type H⁺ ATPase sensível a ortovanadato e insensível a bafilomicina e não possui trocador Ca²⁺ / H⁺.

A *C. krusei* possui um P-type H⁺ ATPase insensível a bafilomicina e sensível a ortovanadato. Possui também um trocador Ca²⁺/H⁺.

Características como a presença de uma cadeia alternativa para a transferência de elétrons, de oxidase alternativa e proteínas desacopladoras, são potenciais alvos para estudos de atividade de alternativas terapêuticas para tratamento de infecções por estes agentes.

Maior aprofundamento dos estudos aqui iniciados, poderão trazer grandes contribuições para um melhor conhecimento do metabolismo destes agentes infecciosos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅKERMAN, E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, **68(2)**: 191-197, 1976.

ABBAS J; BODEY GP; HANNA H; MARDANI M; GIRGAWY E; ABISAID D; WHIMBEY E; HACHEM R; RAAD I - *Candida krusei* Fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. **Arch Inten Med**, **160(17)**: 2659-2664, 2000.

BARBOSA, H.R. Crescimento. In: BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. **Microbiologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Ateneu, 1999. p.103-109.

BASSANI, R.A.; BERS, J.W. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce Ca^{2+} during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **J Physiol**, **453**: 591-608, 1992.

BERRIDGE, M.J. Elementary and global aspects of calcium of calcium signalling. **J Physiol**, **499(2)**: 291-306, 1997.

BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling by calcium. **Nature**, **361**: 315-325, 1993.

BRANCHINI, M.L.; PFALLER, M.A.; CHALBERG, J.R.; FREMPONG, T.; ISEMBERG, H.D. Genotypic Variaton and Slime Production Among Blood and Catheter Isolates of *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, **32(2)**: 452-56, 1994.

CARAFOLI, E. Intracelular calcium homeostasis. **Ann Rev Biochem**, **56**: 395-435, 1987.

CAMOUGRAND, N.; VELOURS, J.; GUÉRIN, M. Resistance of *Candida parapsilosis* to drugs. **Biol Cell**, **58**: 71-78, 1986.

CAMOUGRAND, N.; Velours, G.; Guerin, M. The energetic growth yields of the yeast *Candida parapsilosis*. **Biol Cell**, **61(3)**: 171-175, 1987.

CAMOUGRAND, N.; CHEYROU, A.; HENRY, M.F.; GUÉRIN, M. The alternative respiratory pathway of the yeast *Candida parapsilosis*: oxidation of exogenous NADH. **J Gen Microbiol**, **134**: 3195-3204, 1988.

CAMOUGRAND, N.; ZNIBER, S.; GUERIN, M. The antimycin-A-insensitive respiratory pathway of *Candida parapsilosis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning. **Biochim Biophys Acta**, **1057**: 124-130, 1991.

- CAMOUGRAND, N.; VELOURS, J.; GUERIN, M. Biochemical studies carried out on different groups of *Candida parapsilosis* and *Candida rhagii* strains by comparing some cellular and mitochondrial activities. *A. Von Leeuwenhoek*, **59**: 235-241, 1991.
- CAMOUGRAND, N.; VELOURS, J.; DENIS, M.; GUÉRIN, M. Isolation, characterization and function of the two cytochromes c of the yeast *Candida parapsilosis*. *Biochim Biophys Acta*, **1143**: 135-141, 1993.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem*, **56**: 395-433, 1987.
- CESARO, S.; ROSSETTI, F.; PERILONGO, G.; ROSSI, G.; ZANESCO, L. Fluconazole prophylaxis and *Candida* fungemia in neutropenic children with malignancies *Haematologica*, **78(4)**: 249-51, 1993.
- CASSONE, A.; MATTIA, E.; BOLDRINI, L. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by Concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. *J Gen Microbiol*, **105**: 263-273, 1978.
- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINNI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High Rate of Non-*albicans* Candidemia in Mode of action, mechanisms of resistance. *Clin Microbiol Rev*, **12(4)**: 501- 517, 1999.
- CHRISTINE, C; TERREL, C.L. Antifungal agents: PartII – The azoles. *Mayo Clin Proc* **74**:78-100, 1999.
- COLLIN, B.; Clancy, C.J.; Nguyen, M.H. Antifungal resistance in non- *albicans* *Candida* species. *Drug Resist Updat*, **2(1)**: 9-14, 1999.
- DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H.; SIEDOW, J.N.; WISKICH, J. T. Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. *J Plant Physiol*, **22**: 497-509, 1995.
- DE MEIS, L.; VIANNA, A.L. Energy inteconversion by the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann Rev Biochem*, **48**: 275-292, 1979.
- DOCAMPO, R.; SCOTT, D.A.; VERCESI, A.E.; MORENO, S.N.J. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomas of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, **310**: 1005-1012, 1995.
- DOCAMPO. R.; MORENO, S.N.J. Acidocalcisom: A novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today*, **15**: 443-448, 1999.

- ECHYAY, K.S; WINKLER, E.; FRISCHMUTH, K.; KLINGENBERG, M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by cenzyme Q (ubiquinone). **Proc Natl Acad Sci**, **98**: 1416-1421, 2001.
- ELEWSKI, B.E.; OHIO, C. Mechanisms of action of Systemic Antifungal Agents. **J Am Acad Dermatol**, **28**: 28-34, 1993.
- ELMOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTE, J.B.; SLUSE, F.E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, **13**: 573-581, 1997.
- EPSTEIN, J.B.; RANSIER, A.; LUNN, R.; CHIN, E.; JACOBSON, J.J.; REECE, D.; ARBOR, A. Prophylaxis of Candidiasis in patients with leukemia and bone marrow transplant. **Oral Surg Med Pathol Oral Radiol Endod**, **81**: 291-296, 1996.
- EVERITT, B.S. **The Cambridge dictionary of statistics in the medical species**. Cambridge: Cambridge University Press, pp 32-33, 1999.
- FERRA, C.; DORBBELING, B.N.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A.; LEE, C.K.; GLINGRICH, R.D. *Candida tropicalis* vertebral osteomyelitis: A late sequela of Fungemia. **Clin Infect Dis**, **19**: 697-703, 1994.
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat genet**, **15(3)**: 269-72, 1997.
- GUÉRIN, M.; CAMOUGRAND, N.; CAUBET, R.; ZNEIBER, S.; VELOURS, G.; GUÉLIN, E.; CHEYROU, A. The second respiratory chain of *C. parapsilosis*: a comprehensive study. **Biochimie**, **71**: 887-902, 1989.
- GUÉRIN, M.; CAMOUGRAND, N. Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *C. parapsilosis*: parallel working of the two chains. **Biochim Biophys Acta**, **1184(1)**: 111-117, 1994.
- GUÉRIN, M.; CAMOUGRAND, N. The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. **Eur J Biochem**, **159**: 519-524, 1986.

- GHANNOUM, M.A.; RICE, B.L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance. **Clin Microbiol Rev**, **12(4)**: 501- 517, 1999.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.J. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Biol Chem**, **177**: 751-757, 1949.
- GUIOT, H.F.; HELMING-SCHURTER, A.V.; VAN'T NOODENTE, J.M. The relevance of cultures of catheter-drawn blood and heparin-lock fluid to diagnose infection in hematologic patients. **Ann Hematol**, **64(1)**: 28-34, 1992.
- GUNTER, T.E.; PFEIFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am J Physiol**, **258**: C755-C-756, 1990.
- GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GALVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am J Physiol**, **267**: C313-C339, 1994.
- HANÁK, P.; JEŽEK, P. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis-UCP4 as the ancestral uncoupling protein. **FEBS Lett**, **495**: 137-141, 2001.
- HEATON, G.M.; WAGENVOORD, R.J; KEMP, A.J.R.; NICHOLLS, D.G. Brown-adipose tissue mitochondria: photo affinity labeling of the regulatory site of energy dissipation. **Eur J Biochem**, **82**: 515-521, 1978.
- HELMERHORST, E.J.; MURPHY, M.P.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. **Bioch Biophys Acta**, **1556**: 73-80, 2002.
- HILL, G.C.; DEGN H. Steady-state oxygen kinetics of terminal oxidases in *Trypanosoma mega*. **J Protozool**, **24(4)**: 563-565, 1977.
- HOPPE, J.E.; KLINGERBIEL, T.; NIETHAMMER, D. Orointestinal Yeast colonization of Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients: Surveillance by Quantitative Culture and Serology. **Mycoses**, **38**: 51-57, 1995.
- HOVI, L.; PIHKALA, U.M.S., VETYENRANTA, K., SAXEN, H. Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. **Bone Marrow Transplant**, **26**: 999-1004, 2000.

- HUANG, Y.C.; LIN, T.Y.; LIEN, R.I. Candidemia in special care nurseries: comparison of *albicans* and *parapsilosis* infection. **J Infect**, **40**: 171-175, 2000.
- HUG, S.; PALMER, J. M. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. **Febs Let**, **95**: 217-220, 1978.
- HUH, W.K.; KANG, S.O. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **Biochem J**, **356**: 595-604, 2001.
- JABŮREK, M.; Varecha, M.; Gimeno, R.E.; Dembski, M.; Jezek, P.; Zhang, M.; Burn, P.; Tartaglia, L.A.; Garlid, K.D. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. **J Biol Chem**, **274**(37): 26003-7, 1999.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; HRYNIEWIECKAM, L. Regulation of electron flux in the branched respiratory chain in mitochondria of *Acanthamoeba castellanii*. **Acta Biochim Pol**, **41**(2): 218-20, 1994.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; WAGNER, A.M.; WAGNER, M.J.; HRYNIEWIECKA, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **FEBS Lett**, **411**(1): 10-4997, 1997.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. **J Biol Chem**, **274**: 23198-23202, 1999.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHREIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. **FEBS Lett**, **467**: 145-149, 2000.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance. **Biosci Rep Rev**, **21**: 213-22, 2001.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE, F.E.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE-GOFFART, C.M. Interactions between the cytochrome pathway and the alternative oxidase in isolated *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, **34**(1): 31-40, 2002.

- JEŽEK, P.; GARLID, K.D. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, **30**: 1163-1168, 1998.
- JEZEK, P.; ENGSTOV, A.H.; ZACKOVA, M.; VERCESI, A.E.; COSTA, A.D.; ARRUDA, P.; GARLID, K.D. Fatty Acid Cycling Mechanism And Mitochondrial Uncoupling Proteins. **Biochim Biophys Acta Rev**, **1365(1-2)**: 319-27, 1998.
- KWON-CHUNG, K.J.; POLACHECK, I.; BENETT, J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, **15**: 535-537, 1982.
- KANDA, Y.; YAMAMOTO, R.; CHIZUKA, A.; HAMAKI, T.; SUGURO, M.; ARAI, C.; MATSUYAMA, T.; TAKEZAKO, N.; MIWA, A.; KERN, W.; KAMI, M.; AKIAMA, H.; HIRAI, H.; TOGAWA, A. Prophylactic action of oral fluconazole against fungal infection in neutropenic patients. **Câncer**, **89(7)**: 1611-25, 2000.
- KAPLAN, R.S.; PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, **212(2)**: 279-88, 1983.
- KLEPSER, M.E.; LEWIS, R.E.; PFALLER, M.A. Therapy of *Candida* infections: susceptibility Testing Resistance, and Therapeutic Options. **Ann Pharmacother**, **32**: 353-61, 1998.
- KLINGENBERG, M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **TIBS**, **15**: 108-112, 1990.
- KLINGENBERG, M.; APPEL, M. The uncoupling protein dimer can form a disulfite cross-link between the mobile C-terminal SH groups. **FEBS Lett**, **180**: 123-131, 1989.
- KONEMAM, E.W.; ALLEN, D.S.; DOWELL, V.R. J.R., SOMMERS, H.M.. Micologia. In: KONEMAM, E.W.; ALLEN, D.S.; DOWELL, V.R. J.R., SOMMERS, H.M. **Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido**. São Paulo: Medicina Panamericana, 1993.p.537-599.

- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Criptococose. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1991.p.307-317.
- LAMBOWITZ, A.M.; SABOURIN, J.R.; BERTAND, H.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Mol Cell Biol**, 9: 1362-1364, 1989.
- LARONE, D.V. **Medically Important Fungi: a Guide to Identification**. 3^a ed, Washington: American Society for microbiology, 1984.
- LEITHOLD, L. **O cálculo com geometria Analítica**. 2^aed, São Paulo: Harper & Row, 1982.p.344-351.v.I
- LEHNINGER, A.L.; COX, Y. M.; NELSON, D.L. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: LEHNINGER, A.L.; COX, Y. M.; NELSON, D.L. **Princípios de bioquímica**. 2a ed, Barcelona: Omega, 1995.p.404-424.
- LEVITZ, M.S. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of *Cryptococcus*. **Rev Infect Dis**, 13: 1163-9, 1991.
- LORTTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal Prophylaxis During Neutropenia and Immunodeficiency. **Clin Microbiol Rev**, 10(3): 4477-504, 1997.
- LU, H.G., ZHONG, L., CHANG, K.P., DOCAMPO R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana* amazonensis amastigotes. **J Biol Chem** 272(14): 9464-73, 1997.
- LUNEL, F.M.V.; MEIS, J.F.G.M.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 34: 213-20, 1999.
- MAO, W.G.; YU, X.X.; ZHONG, A.; LI, W.L.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. **FEBS Lett**, 443: 326-330, 1999.

- MATTIASSON, G.; SHAMLOO, M.; GIDO, G.; MATHI, K.; TOMASEVIC, G.; YI, S.; WARDEN, C.H.; CASTILHO, R.F.; MELCHER, T.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; NIKOLICH, K.; WIELOCH, T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med*, (in press) 2003.
- MILANI, G.; JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett*, **24451**: 1-5, 2001-a.
- MILANI, G.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport into an intracellular acidic compartment of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett*, **500**: 80-84, 2001-b.
- MITCHELL, P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiostatic consequences. *Science*, **206**: 1148-1159, 1979.
- MEUNIER, F.; AOUN, M.; BITAR, N. Candidemia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, **14(2)**: 485-91, 1992.
- MORENO, S.N.J.; ZHONG, L. Acidocalcisoms in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem J*, **313**: 655-659, 1996.
- MOMIM, F.; CHANDRASEKAR, P.H. Antimicrobial Prophylaxis in Bone Marrow Transplantation. *Ann Intern Med*, **123**: 205-15, 1995.
- MOORE, A.; SIEDOW, J. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1059**: 121-140, 1991.
- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **170**: 511-522, 1978.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. Respiratory Chains. In: NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. *Bioenergetics 2*. 6a ed. London: Academic Press, 2002-a.p.89-154.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. Metabolite and ion transport. In: NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. *Bioenergetics 2*. 6a ed. London: Academic Press, 2002-b.p.219-249.

NUCCI, M.. Infecções oportunistas em pacientes com leucemias e linfomas. In: LACAZ, C.S.; Machado, C.M. **Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 2000.p.73-93.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; SILVEIRA, F.; RICHTMANN, R.; SALOMAO, R.; BRANCHINI, M.L.; SPECTOR, N. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect Control Hosp Epidemiol**, **19(11)**: 846-50, 1998.

OROZCO, A.S.; HIGGINBOTHAM, L.M.; HITCHCOCK, A.; PARKINNSON, T.; FALCONER, D.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A.; FILLER, S.G. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, **42(10)**: 2645-2649, 1998.

PASSOS, A.P.D.; GARCIA, C.R.S. Inositol 1,4,5, trisphosphate induced Ca^{2+} release from chloroquine sensitive and insensitive intracellular stores in the intra erythrocytic atage of the malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. **Biochem Biosphys Res Commun**, **245**: 155-160, 1998.

PHILOSOPH, H.; ZIBERSTEIN, D. Regulaton of intracellular calcium in promastigotes of the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, **264**: 10420-10424, 1989.

POSTERARO, B.; ROMANO, L.; SANGUINETTI, M.; MASUCCI, L.; MORACE, G.; FDDA, G. Commercial Systems for fluconazole Susceptibility Testing of Yeasts: Comparison with the Broth Microdilution Method. **Diagn Microbiol Infect Dis**, **38**: 29-36, 2000.

RIAL, E.; POSTIE, A.; NICHOLLS, D.G. Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. **Eur J Biochem**, **137**: 197-203, 1983.

RICH, P.R. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. **FEBS Lett**, **96**: 252-256, 1978.

ROCCO, R.T.; REINERT, E.S.; SIMMS, H.H. Effects of fluconazole admistration in critically III patients (Analysis of bacterial and fungal resistance). **Arch Sur**, **135**: 160-165, 2000.

- RONNEY, E.K.; GROSS, J.D. ATP-driven $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport in acid vesicles from *Dictyostelium*. **Proc Natl Acad Sci USA**, **89**: 8025-8029, 1992.
- ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R. Clinical epidemiological study the 171 cases of *Cryptococcus*. **Clin Infect Dis**, **18**: 369-80, 1994.
- SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBEM, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M.; GREGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LEVI-MEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIN, M.; RICHARD, D.; WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RIQUIER, D. BMCP1-A novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. **J Biol Chem**, **273**(51): 34611-5, 1998.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK PA; BILLE J - The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, **43**(11): 2753-65, 1999.
- SHEPHERD, M.G.; CHIN, C.M.; SULLIVAN, P.A. The alternate respiratory pathway of *Candida albicans*. **Arch Microbiol**, **116**: 61-67, 1978.
- SHIGEMATSU, M.L.; UNO, J.; ARAI, T. Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, **21**(6): 919-24, 1982.
- SCHIMID, J.; HUNTER, P.R.; WHITE, G.C.; NAND, A.K.; CANNON, R.D. Physiological traits Associated with Success of *Candida albicans* Strain as Commensal Colonizers and Pathogens. **J Clin Microbiol**, **33** (11): 2920-26, 1995.
- SIEDOWN, J.N.; UMBACH, A.L. Plant mitochondrial cyanide-resitant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biocem Biophys Acta**, **1459**: 432-439, 1995.
- SIDRIM, J.J.C. Entendendo os ramos de interesse da micologia médica. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B.; ROCHA, M.F.R. **Fundamentos Clínicos e laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.p.14-18.
- SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett Rev**, **294**(3): 158-62, 1991.

- SKULACHEV, V.P.; Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochem Biosphys Acta**, **1363**: 100-124, 1998.
- SLAVIN, M.A.; OSBORNE, B.; ADAMS, R.; LEVENSTEIN, M.J.; SCHOCH, H.G.; FELDMAN, A.R.; MEYERS, J.D.; BOWDEN, R. Efficacy Nd Safety of. Fluconazole Prophylaxis for Fungal Infections After Marrow Transplantation - A prospective. Randomized, Double-Blind Study. **J Infect Dis**, **171**: 1545-52, 1995.
- SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. **Braz J Med Biol Res**, **33(3)**: 259-268, 2000.
- SORRENTINO, V.; VOLPE, P. Ryanodine receptors: how many, where and why? **Trends Pharmacol Sci**, **14**: 98-103, 1993.
- STUART, J.A.; BRINDLE, K.M.; HARPER, J.A.; BRAND, M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. **J Bioenerg Biomembr**, **31(5)**: 517-25, 2000.
- SUGGAR, A. Empirictreatment of fungal infections in the neutropenic host. **Arch Inter Méd**, **150**: 2258-64, 1990.
- THÉVENOD, F.; SCHULTZ, I. H⁺-dependent calcium uptake into an IP3-sensitive calcium pool from rat parotid gland. **Am J Physiol**, **255**: G429-440, 1988.
- THÉVENOD, F.; DEHLINGER-KREMER, M.; KEMMER, T.P.; CHRISTIAN, A.L.; POTTER, B.V.L.; SCHULTZ, I. Characterizaton of inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive (IsCaP) and -insensitive (IisCap) nonmitochondrial Ca²⁺ pools in rat pancreatic acinar cells. **J Membr Biol**, **109**: 173-186, 1989.
- TOLLEMAR, J.; GROSS, N.; DOLGIRAS, N.; JARSTRAND, C.; RINGDÉN, O.; HAMMARSTROM, L. Fungal prophylaxis by Reduction of Fungal Colonization by Oral Administration of Bovine Anti - *Candida* Antibodies in Bone Marrow Transplant Recipients. **Bone Marrow Transplantation**, **23**: 283-90, 1999.
- TRONCHIN, G.; POULAIN, D.; HERBAUT, J.; BIGUET J. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. II. Evidence for a cell wall coat using Concanavalin. **A J Ultrast Res**, **75**: 50-59, 1981.

- TRONCHIN, G., POULAIN, D.; HERBAUT, J., BIGUET, J. Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies. **Eur J Cell Biol** **26**: 121-128, 1981 b.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, **29(4)**: 810-2, 1991.
- VERCESI, A.E.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, **304**: 227-233, 1994.
- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, **375**: 24, 1995.
- VOSS, A.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A.; WENZEL, R.P.; DOEBBELING, B.N. Investigation of the Sequence of Colonization and Candidemia in Nonneutropenic Patients. **J Clin Microbiol**, **32(4)**: 975-80, 1994.
- WARREN, N.G. AND HAZEN, K.C. *Candida*, *Cryptococcus*, and others yeasts of medical importance. In: MURRAY, P.R. **Manual of clinical microbiology**. 7 Ed, Washington: American Society for Microbiology, 1999.p.1184-1211.
- WINGARD, J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G.; JHONSON, T.R.; KARP, J.E.; SARAL, R. Increase in *Candida krusei* Infection Among Patients With Bone Marrow Transplant and Neutropenia Treated Prophylactically With Fluconazole. **N Engl Med**, **325(18)**: 1274-77, 1991.
- WINKLER, E.; KLINGERBERG, M. Effect of fatty acids on H^{+} transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **J Biol Chem**, **269**: 2508-2515, 1994.
- WRIGHT, W.L.; WENZEL, R.P. Nosocomial *Candida* - Epidemiology, Transmission and Prevention. **Infect Dis Clin North Am**, **11(2)**: 411-25, 1997.
- ŽÁČKOVÁ, M.; JEZEK, P. Reconstitution of novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Biosci Rep**, **22(1)**: 33-46, 2002.

8- *ANEXOS*

ANEXO I

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. albicans* ATCC 90028 em meio YEPD.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,2626
1	0,2878
2	0,2966
3	0,3354
4	0,3924
5	0,4810
6	0,7107
7	0,9846
8	1,2372
9	1,5762
10	1,8420
11	1,9805
12	2,0311
13	2,0506
14	2,0611

ANEXO 2

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. albicans* ATCC 90028 em meio YEPG.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,1528
1	0,1623
2	0,1775
3	0,2138
4	0,2704
5	0,3852
6	0,5775
7	0,8245
8	1,0713
9	1,2377
10	1,5592
11	1,6103
12	1,7611
13	1,7741
14	1,8591
15	1,9606
16	1,9736
17	2,0019
18	2,0088

ANEXO 3

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. krusei* ATCC 6258 em meio YEPD.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,16
1	0,2406
2	0,2762
3	0,4068
4	0,6482
5	1,1132
6	1,6561
7	1,8971
8	1,9103
9	2,1045
10	2,1684
11	2,2853
12	2,3503
13	2,3996
14	2,4275
15	2,4318
16	2,4487
17	2,4556
18	2,5031
19	2,5192
20	2,5205
21	2,5857
22	2,5414
23	2,6314
24	2,6292
25	2,6242
26	2,574
27	2,6182

ANEXO 4

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. krusei* ATCC 6258 em meio YEPG.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,144
1	0,1681
2	0,167
3	0,2649
4	0,2843
5	0,368
6	0,5628
7	0,7288
8	0,9639
9	1,2737
10	1,4544
11	1,5667
12	1,8355
13	2,0392
14	2,1391
15	2,2139
16	2,3611
17	2,4004
18	2,4281
19	2,4775
20	2,5276
21	2,5612
22	2,4153
23	2,8033
24	2,7989
25	2,8272
26	2,7536
27	2,7435

ANEXO 5

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 em meio YEPD.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,2025
1	0,2092
2	0,2145
3	0,2324
4	0,2522
5	0,2531
6	0,2856
7	0,3262
8	0,3902
9	0,4525
10	0,4836
11	0,5417
12	0,6798
13	0,9133
14	1,223
15	1,4496
16	1,7389
17	1,9507
18	2,2262
19	2,3938
20	2,5494
21	2,6489
22	2,7042
23	2,9103
24	2,956
25	2,9749
26	2,9644
27	2,9747

ANEXO 6

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019 em meio YEPG.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,109
1	0,22
2	0,1225
3	0,1323
4	0,152
5	0,1926
6	0,2495
7	0,3042
8	0,4175
9	0,5278
10	0,6777
11	0,8628
12	0,9764
13	1,4792
14	1,7365
15	1,9694
16	2,1673
17	2,3431
18	2,4156
19	2,4982
20	2,5729
21	2,6536
22	2,566
23	2,7649
24	2,7913
25	2,796
26	2,8364
27	2,7522

ANEXO 7

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. neoformans* ATCC 90112 em meio YEPD.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,2077
1	0,2102
2	0,2127
3	0,2128
4	0,2157
5	0,2212
6	0,2262
7	0,2426
8	0,2514
9	0,271
10	0,2915
11	0,3321
12	0,4132
13	0,4552
14	0,5728
15	0,7739
16	1,8452
17	1,0178
18	1,1639
19	1,5999
20	1,8066
21	1,9261
22	2,1799
23	2,2622
24	2,2611
25	2,3657
26	2,4609
27	2,5398
28	2,7437
29	2,7744
30	2,8325

31	2,8864
32	2,9242
33	2,9478
34	2,9545
35	2,9556
36	2,9732
37	2,9641
38	2,9532
39	2,983

ANEXO 8

Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. neoformans* ATCC 90112 em meio YEPG.

Tempo (x)	Densidade óptica (Y)
0	0,1268
1	0,1284
2	0,1312
3	0,1335
4	0,1351
5	0,1362
6	0,1393
7	0,1517
8	0,1637
9	0,1754
10	0,1946
11	0,2187
12	0,2776
13	0,3015
14	0,3674
15	0,4664
16	0,5321
17	0,6476
18	0,7707
19	0,8848
20	0,998
21	1,1016
22	1,1758

23	1,2701
24	1,4631
25	1,6929
26	1,8097
27	1,8678
28	2,1324
29	2,2575
30	2,5141
31	2,4974
32	2,5041
33	2,521
34	2,5502
35	2,7241
36	2,749
37	2,8459
38	2,9058
39	2,9021

ANEXO 9

Trabalho completo submetido para publicação na revista FEBS

Uncoupling Protein in *Candida albicans*

Renata Alves Cavaleiro^a, Fabiane Fortes^a, Jiri Borecky^{a,b}, Valéria C. Faustinoni^a, Angélica Z. Schreiber^a and Aníbal E. Vercesi^{a,*}

^aDepartamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

^bCentro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6010, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Key words: *Candida albicans* spheroplasts, mitochondria, respiratory chain, mitochondrial membrane potential, uncoupling protein

Footnotes:

***Corresponding author (inclusive proofs): Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi**

Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6111
13083-970 Campinas, SP, Brazil.
Phone: (55-19) 3788-7330
Fax: (55-19) 3788-1118
e-mail: anibal@unicamp.br

Abbreviations: AA, antimycin A; AOx, alternative oxidase; BHAM, benzohydroxamic acid; BSA, bovine serum albumin; CAT, carboxyatractyloside; CSPD, Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decane}-4-yl) phenylphosphate; $\Delta\Psi$ mitochondrial potential; DTT, dithiothreitol; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyhydrazone; FFA, free fatty acid; LA, linoleic acid; PAR, parallel respiratory chain; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PUMP, plant uncoupling mitochondrial protein; Q_x, alternative ubiquinone; ROS, reactive oxygen species; SHAM, salicyl hydroxamic acid; UCP, uncoupling protein

Abstract:

Respiration, membrane potential ($\Delta\Psi$), and oxidative phosphorylation of *Candida albicans* mitochondria were assayed *in situ* in spheroplasts obtained by lyticase treatment. Mitochondria generated and sustained a stable $\Delta\Psi$ respiring on NAD-linked substrates, succinate, or TMPD/ascorbate. Rotenone inhibited respiration by 30% and antimycin A, myxothiazol, or cyanide by 85%. The cyanide-insensitive respiration was blocked by BHAM. *C. albicans* mitochondria *in situ* presented a carboxyatractyloside-insensitive increase of $\Delta\Psi$ induced by ATP and BSA, suggesting the existence of an uncoupling protein. This was confirmed by immunodetection and respiration experiments with isolated mitochondria. In the presence of BSA, these mitochondria were able to phosphorylate ADP. [101 words]

1. Introduction

Candidiasis are common infections of the skin, oral cavity, esophagus, gastrointestinal tract, vagina, and vascular system of men, and has become a major cause of mortality in immunocompromised patients, including those with AIDS [1-3] or debilitated in some other way [4]. Within years 2001-2003, a total of 2803 *Candida spp.* strains were isolated from various tissues of patients from The University of Campinas Hospital, UNICAMP, Brazil [5]. The strains were identified and classified into the following species: *C. albicans* (57%), *C. tropicalis* (13%), *C. glabrata* (10%), *C. parapsilosis* (6%), *C. krusei* (3.4%), and 10.6%, which belonged to other yeast genera [5]. Current chemotherapy against these fungi suffers a number of deficiencies, as low specificity, toxicity, and drug resistance. Most of antifungal drugs react with ergosterol or inhibit its production. [6]. Simultaneously, there is an alarming increase in drug resistance to antifungal agents [3,7]. Therefore, it is very important to search for biological targets that could be exploited for the rational development of improved therapies.

Mitochondria are the major source of cellular aerobic energy generated by oxidative phosphorylation. *C. parapsilosis* mitochondria possess three types of respiratory pathways [8]: i) the classical respiratory chain, ii) a secondary parallel respiratory chain (PAR) consisting of alternative ubiquinone (Q_x), cytochromes ($cytb_{PAR}$) and ($cytc_{PAR}$), and a terminal oxidase (oxc_{PAR}) insensitive to antimycin A (AA) but inhibited by amytal [9], and high concentrations of SHAM, myxothiazol [10], and KCN [11], and finally iii) the constitutive alternative oxidase (AOx) [12,13]. The high resistance of *C. parapsilosis* to drugs [14] has been attributed to the presence of these two alternative electron transfer systems [8]. Recently, Helmerhorst *et al.*, [13] reported that *C. albicans* also contains a variety of respiratory systems whose expression depends on growth conditions. The authors reported that the *C. albicans* ability to regulate the expression of the individual complexes and the partitioning of electrons between both respiratory chains may be the reason why the cells can survive under conditions of oxidative stress.

A plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) was discovered in potato tubers in 1995 [15] as the first plant homologue of the mammalian uncoupling protein expressed exclusively in brown adipose tissue (UCP, now UCP1; 16). Similarly to UCP1,

PUMP catalyzes a protonophoric cycle across the inner mitochondrial membrane, which is activated by free fatty acids (FFA) [15,17] and that dissipates $\Delta\mu_{H^+}$ as heat. The existence of the plant homologue of UCP1 gave rise to a search for other UCP homologues. During 1997-2001, four new UCPs and three PUMPs were identified in various species [18,19]. An UCP was also shown recently in *Candida parapsilosis* [20]. Evidence has been presented that the new UCPs [21], including the plant UCPs, are involved in cell defense against oxidative stress [22-25]. They are able to induce mild uncoupling, thus increasing the rate of respiration and decreasing the production of reactive oxygen species (ROS) [22-25]. Therefore, it is of great interest to study *C. albicans* UCP with the aim to understand its role in the ability of these cells to resist to stress.

In the present study we demonstrated that spheroplasts obtained from cultures of *C. albicans* at the middle of their exponential phase of growth, possess intact mitochondria able to phosphorylate ADP and an uncoupling protein (CaUCP) homologous to the previously described *C. parapsilosis* uncoupling protein (CpUCP; 20).

2. Material and methods

2.1. Test microorganism

Candida albicans ATCC 90028 was obtained from the American Type Culture Collection. It is a quality control strain for antifungal susceptibility testing and was maintained in sterile water and Sabouraud Dextrose Agar (DIFCO). The cell cultures were grown in YEPG medium [26] at 37°C and 200 rpm. To determine the inflexion point of exponential growth, a sample was collected every 1 hour and the culture density was determined spectrophotometrically at 530 nm. Experimental points were fitted using logistic dose-response model and a maximum growth rate in exponential phase was calculated as its power parameter.

2.2. Spheroplasts preparation

For standard preparation [27], 1 l of culture was harvested by centrifugation, and cells were washed once with cold water and once with A buffer (1 M sorbitol, 10 mM MgCl_2 , and 50 mM Tris-HCl, pH 7.8). Cells were resuspended in A buffer (3 ml/g of cells) supplemented with 30 mM dithiothreitol (DTT). After 15 min incubation at room temperature with shaking, cells were harvested, resuspended in A buffer containing lyticase (1 mg/g of cells) and 1 mM DTT, and incubated at 30°C until about 90% of cells converted to spheroplasts (~60 min). The reaction was stopped by an equal volume of ice-cold A buffer, and spheroplasts were washed twice with A buffer. Protein concentration of the final suspension was determined by biuret method [28] in the presence of 0.2% deoxycholate.

2.3. Isolation of mitochondria

The spheroplasts were resuspended in B₁ buffer (0.6 M mannitol, 1 mM EDTA, 0.5% BSA, 1 mM PMSF, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Spheroplasts were mechanically broken using a Dounce homogenizer at maximum of 10 strokes. Cell debris was removed by centrifugation at 1000 x g for 10 min. Mitochondria were pelleted by 10-min centrifugation at 10500 x g and washed with B₂ buffer (0.6 M mannitol, 1 mM EDTA, 1% BSA, 10 mM Tris-HCL, pH 7.0). The last wash was made in B₂ medium without BSA and EDTA [20]. The mitochondrial protein concentration was determined by the biuret method [28].

2.4. Estimation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$)

Mitochondrial membrane potential of permeabilized cells was monitored by measuring the fluorescence spectrum of safranin O (Hitachi F4500 fluorescence spectrophotometer) at the wave pair 495-586 nm [29,30]. All experiments were performed at 28°C in 2 ml standard incubation medium containing: 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10

mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM KH_2PO_4 , and 1 mM MgCl_2 , with 1 mg of mitochondrial protein.

2.5. Oxygen uptake

Oxygen uptake was measured polarographically at 28°C using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments) in 1.3 ml of standard incubation medium containing 1 mg of mitochondrial protein [20].

2.6. Immunodetection of *Candida albicans* UCP (CaUCP)

Total proteins extracted from *Candida albicans* spheroplasts were separated on a 10% polyacrylamide gel (standard SDS-PAGE). Protein bands were transferred to a nylon membrane (Hybond N) in a semi-dry blotting apparatus (Pharmacia). The membrane was blocked overnight in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, and 10% (w/v) non-fat dry milk and incubated with the anti-AtPUMP1 polyclonal antibody (1:1000 dilution). After incubation with anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1:5000 dilution), the membrane was developed in the dark in 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, and CSPD (1:2000 dilution) for 5 min. The bands were visualized by autoradiography and scanned with Eagle-Eye photo documentation system [31].

2.7. Chemicals

ATP, FCCP, succinate, EGTA, antimycin A, myxothiazol, CAT, BSA, linoleic acid, cyanide, TMPD, and lyticase were purchased from Sigma. CSPD was from Tropix. All other reagents were of analytical grade.

3. Results and Discussion

In the present work we characterized mitochondrial bioenergetic pathways in *C. albicans* ATCC 90028 using a method previously applied to *C. parapsilosis* [27]. Spheroplasts prepared from cell culture grown to middle exponential phase were permeable to mitochondrial substrates and inhibitors without affecting the functional integrity of the spheroplast mitochondria.

With the aim to search for the presence of uncoupling protein and to examine its activity in these mitochondria we characterized the classical respiratory chain and its ability to sustain $\Delta\Psi$ oxidizing different respiratory substrates. Fig 1 shows that spheroplast mitochondria *in situ* suspended in reaction medium containing a cocktail of NAD-linked substrates generated and sustained a stable membrane potential. The subsequent inhibition of Complex I by rotenone resulted in a decrease of about 30% in the respiration rate and $\Delta\Psi$. This suggests a significant contribution of this complex to $\Delta\Psi$ generation, in agreement with the results obtained by Helmerhorst *et al.*, [13] who found the presence of a rotenone-sensitive and a proton pumping NADH-Q oxidoreductase similar to Complex I in *C. albicans* ATCC 10231. The addition of 5 mM succinate restored $\Delta\Psi$ but oxygen consumption level was unchanged or even slightly decreased, probably due to the increase in $\Delta\Psi$ and/or possibly to a negative regulation of CN⁻-insensitive pathways [14]. Blockage of Complex III by antimycin A (AA) or myxothiazol promoted collapse of $\Delta\Psi$ and more than 90% reduction in respiration. Respiration rate and $\Delta\Psi$ were restored by the addition of TMPD/ascorbate. Finally, inhibition of Complex IV by 1 mM KCN was accompanied by a complete loss of $\Delta\Psi$ and about 85% decrease in the respiration rate. Drastic changes in $\Delta\Psi$ after inhibition of Complexes III and IV suggest their essential role in energy conservation by *C. albicans* mitochondria. The CN⁻-insensitive respiration was inhibited by 2 mM BHAM, suggesting the presence of alternative oxidases, as previously described [8,13]. Helmerhorst *et al.*, [13] reported that respiration by *C. albicans* ATCC 10231 cells was almost insensitive to SHAM while respiration by cells grown in the presence of AA was completely inhibited by 5 mM SHAM, indicating that the alternative pathway was the only pathway utilized.

An uncoupling protein, other energy-dissipating system that can also modulate $\Delta\Psi$ and the respiration rate, was recently identified in fungi kingdom as CpUCP from *C. parapsilosis* [20]. Interestingly, UCP is absent in *Saccharomyces cerevisiae* [32]. The existence of CpUCP homologue (CaUCP) was also detected in *C. albicans* mitochondria by immunoblot analysis using anti-AtPUMP1 antibody [19]. The immunoblot revealed 2 protein bands of about 32 kDa (Fig. 2, lane Ca) in a sample of total protein extract from *C. albicans* cells. The existence of two bands in *C. albicans* suggests the presence of more than one UCP as it occurs in mammals and plants [32,33]. The single band detected in total protein extract from *C. parapsilosis* cells (line Cp) was used as a positive control (Fig. 2). Uncoupling proteins are usually activated by FFAs and inhibited by ATP [34-36]. Accordingly, $\Delta\Psi$ measurements in *C. albicans* mitochondria *in situ* demonstrated an increase of $\Delta\Psi$ after consecutive additions of 5 mM ATP and 0.5% BSA, which binds FFAs (Fig. 3). The dotted line (c) shows the $\Delta\Psi$ generated by *C. albicans* mitochondria in the presence of ATP and BSA from the beginning of the experiment. In contrast, an addition of linoleic acid (LA) caused $\Delta\Psi$ decrease that was reversed by BSA (not shown). Correspondingly, in experiments with isolated *C. albicans* mitochondria the ADP/O ratio decreased from 2.4 to 1.1 in the presence of 2 μ M LA whereas State 4 respiration was stimulated by about 75% (Fig. 4). These results mean that the LA-induced H^+ recycling can efficiently divert energy from oxidative phosphorylation in State 3 respiration even if the State 3 respiration rate is not modified. These experiments were performed in the presence of 1 μ M carboxyatractyloside (CAT) to avoid ADP/ATP carrier contribution to the FFA-induced H^+ re-uptake through FFA anion translocation [22]. The presence of glutamate, pyruvate, and malate/ α -ketoglutarate also prevented FA anion transport through the corresponding carriers [22]. Therefore, the observed uncoupling of oxidative phosphorylation caused by LA can be attributed to CaUCP. Fig 5 shows that in the presence of ATP and BSA, *C. albicans* mitochondria *in situ* can efficiently phosphorylate ADP.

The presence of uncoupling protein in *Candida ssp.* implies its possible role in yeast mitochondrial energy metabolism and cell protection against ROS overproduction. This protective role against ROS was already described for UCP2 [21] and UCP3 [25]. Mitochondria from underexpressing mice had significantly higher levels of oxidative

damage than wild-type controls [25]. In addition, leaf discs of transgenic tobacco plants overexpressing *AtPUMP1* showed a considerable increase in the tolerance to oxidative stress promoted by exogenous hydrogen peroxide as compared with wild-type control plants [23].

The presence in *C. albicans* of an alternative electron transfer chain [13] and alternative oxidase [37] absent in animal cells offers exceptional targets for the design of new chemotherapeutic agents. In addition, inhibition of the uncoupling protein could lead to increased production of ROS and cell death providing an additional target for drug design.

Acknowledgements: The authors thank Prof. Dr. R. J. Docampo for a critical reading of the manuscript. A.E.V. and A.Z.S. are supported by CNPq/PRONEX through the federal Grant for Centers of Excellence (grant No. 66.1192/1997-2) and by FAPESP (grant No. 98/13012-5). R.A.C. and V.C.F. are supported by CAPES, F.F. by Ph.D. grant from CNPq, and J.B. by FAPESP (grant No. 00/08019-2).

References

- [1] Georgopapadakou, N.H. and Tkacz, J.S. (1998) *Trends Microbiol.* 3, 98-104.
- [2] Rex, J.H., Pfaller, M.A., Rinaldi, G., Polak, A. and Galgiani, J.N. (1993) *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 367-381.
- [3] Sanglard, D. and Odds, F.C. (2002) *Lancet Infect. Dis.* 2, 73-85.
- [4] Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001) *Trends Microbiol* 9, 326-335.
- [5] Annual Register of Mycoses "Micoteca", Dept. Clin. Pathol., University of Campinas Hospital, Campinas, SP, Brazil
- [6] Diamond, R.D. (1991) *Rev. Infect. Dis.* 13, 98-104.
- [7] Rex, J.H., Rinaldi, G. and Pfaller, M.A. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1-8.
- [8] Milani, G., Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C. M., Schreiber, A.Z., Vercesi, A.E. and Sluse, F.E. (2001) *FEBS Lett.* 24451, 1-5.
- [9] Camougrand, N., Cheyrou, A., Henry, M.F. and Guérin, M. (1988) *J. Gen. Microbiol.* 134, 3195-3204.
- [10] Camougrand, N., Zniber, S. and Guérin, M. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1057, 124-130.
- [11] Guérin, M. and Camougrand, N. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 519-524.
- [12] Wagner, A.M. (1995) *FEBS Lett.* 368, 339-342.
- [13] Helmerhorst, E.J., Murphy, M.P., Troxler, R.F. and Oppenheim, F.G. (2002) *Bioch. Biophys. Acta* 1556, 73-80.
- [14] Camougrand, N., Velours and G. and Guérin, M. (1986) *Biol. Cell* 58, 71-78.
- [15] Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.F., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (1995) *Nature* 375, 24.
- [16] Ricquier, D. and Kader, J.C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577-583.
- [17] Ježek, P., Engstova, H., Zachova, M., Vercesi, A. E., Costa, A.D.T., Arruda, P. and Garlid, K.D. (1998) *Bioch. Biophys. Acta* 365, 319-326.

- [18] Bouillaud, F., Couplan, E., Pecqueur, C. and Ricquier, D. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 107-119.
- [19] Hanák, P. and Ježek, P. (2001) *FEBS Lett.* 495, 137-141.
- [20] Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A.Z., Sluse, F.E. and Vercesi, A.E. (2000) *FEBS Lett.* 467, 145-149.
- [21] Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C. H., Castilho, R.F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K. and Wiesloch, T. (2003) *Nature Medicine* (in press).
- [22] Schulachev, V.P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100-124.
- [23] Brandalise, M., Maia, I. G., Borecký J., Vercesi, A. E. and Arruda P. (2003) *J. Bioenerg. Biomembr.* (in press).
- [24] Vidal-Puig, A. J, Grujic, D., Zhang C.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M. and Lowell, B.B. (2000) *J. Biol. Chem.* 265, 16258-16266.
- [25] Brand, M.D., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Roebuck, S.J., Buckingham, J.A., Clapham, J.C. and Cadenas, S. (2002) *Biochem. J.* 368, 597-603.
- [26] Camougrand, N., Velours, G. and Guerin, M. (1987) *Biol. Cell* 61, 171-175.
- [27] Milani, G., Schreiber, A.Z. and Vercesi, A.E. (2001) *FEBS Lett.* 500, 80-84.
- [28] Gornall, A.G., Bardawill, C. J. and David, M. J. (1949) *Biol. Chem.* 177, 751-757.
- [29] Åkerman, K.E.O. and Wikstrom, M.K.F. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191-197.
- [30] Vercesi, A.E., Bernardes, C.F., Hoffmann, M.E., Gadelha, F.R. and Docampo, R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 14431-14434.
- [31] Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L. and Sluse, F.E. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23198-23202.
- [32] ElMoualij, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur J. and Sluse, F.E. (1997) *Yeast* 13, 573-581.
- [33] Huh, W.K. and Kang, S.O. (2001) *Biochem. J.* 356, 595-604.

- [34] Žáčková, M. and Ježek, P. (2002) Biosci. Rep. 22, 33-47
- [35] Jabůrek, M., Vařecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Ježek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. and Garlid, K.D. (1999) J. Biol. Chem. 264, 26003–26007.
- [36] Jezek, P., Costa, A.D.T. and Vercesi, A.E. (1996) J. Biol. Chem. 261, 32643-32648.
- [37] Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Vercesi, A.E. and Sluse, F.E. (2001) Biosci Rep. 21, 213-22.

Figure Legends

Fig 1. Effect of various substrates and inhibitors on oxygen consumption (A) and mitochondrial membrane potential (B) of *C. albicans* spheroplasts. *C. albicans* spheroplasts (1 mg/ml) were incubated in reaction medium containing 125 mM sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM P_i , 1 mM $MgCl_2$, 65 mM KCl, and 5 mM cocktail (malate, glutamate, pyruvate, and α -ketoglutarate). The additions of substrates: 5 mM succinate and 100 μ M TMPD/ascorbate (TMPD), and inhibitors: 4 μ M rotenone, 2 μ M antimycin A (AA) and/or 2 μ M myxothiazol (Mix), 1 mM KCN, and 2 mM BHAM, are indicated by arrows. Numbers on the trace indicate O_2 consumption rates in nmol O/min/mg protein.

Fig 2. Immunodetection of uncoupling proteins in total protein extract from *C. albicans* (2 bands in lane Ca) with polyclonal antibody raised against *Arabidopsis* PUMP1. *C. parapsilosis* cell protein extract containing CpUCP (single band in lane Cp) was used as a positive control. Positions of molecular-weight standards are indicated by arrows.

Fig.3. Effect of 5 mM ATP and 0.5% BSA on mitochondrial of *C. $\Delta\Psi$ albicans* spheroplasts in the presence of 1 μ M CAT. Spheroplasts (1 mg/ml) were added to a standard medium containing 5 mM substrate cocktail and 5 μ M safranin O (line b). Line (a) is a control without BSA and line (c) is a control with ATP and BSA present from the beginning of the experiment.

Fig 4. Effect of LA on oxidative phosphorylation. *C. albicans* mitochondria (1 mg/ml) were added to 1.3 ml standard incubation medium (28°C) with 5mM substrate cocktail in the absence or in the presence of 2 μ M LA (+LA). Addition of 200 μ M ADP is indicated by the arrow (ADP). Numbers on the traces indicate O_2 consumption rates in nmol O/min/mg protein.

Fig 5. ADP phosphorylation by *C. albicans* spheroplast mitochondria. Spheroplasts (1.0 mg/ml) were incubated in reaction medium containing 5 mM substrate cocktail, 0.05% BSA, and 5 μ M safranin O. Spheroplasts (cells), 200 μ M ADP, and 1 μ M FCCP were added where indicated by the arrows. Dotted line represents a control experiment without ADP addition.

Figure 1

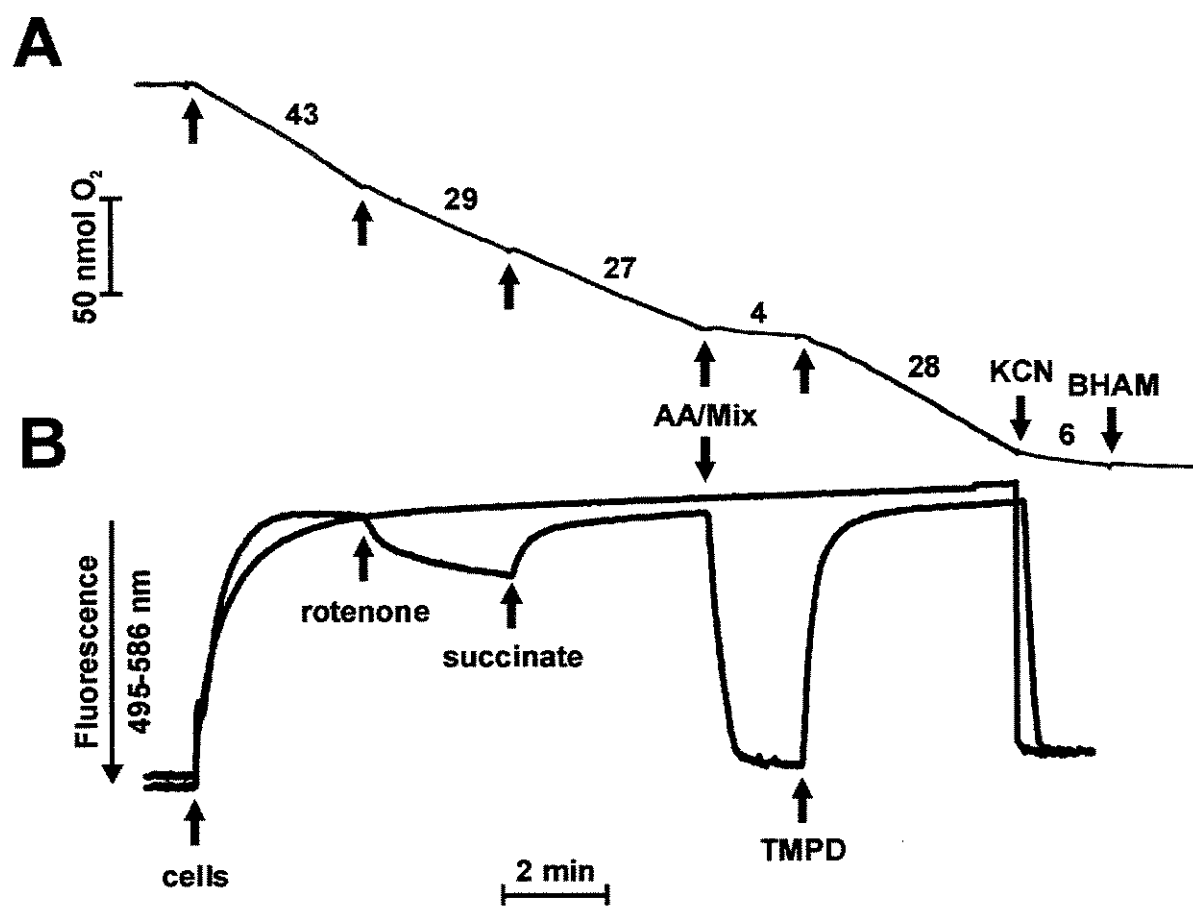


Figure 2

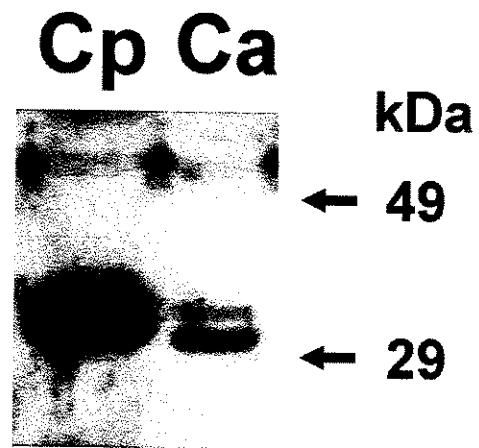


Figure 3

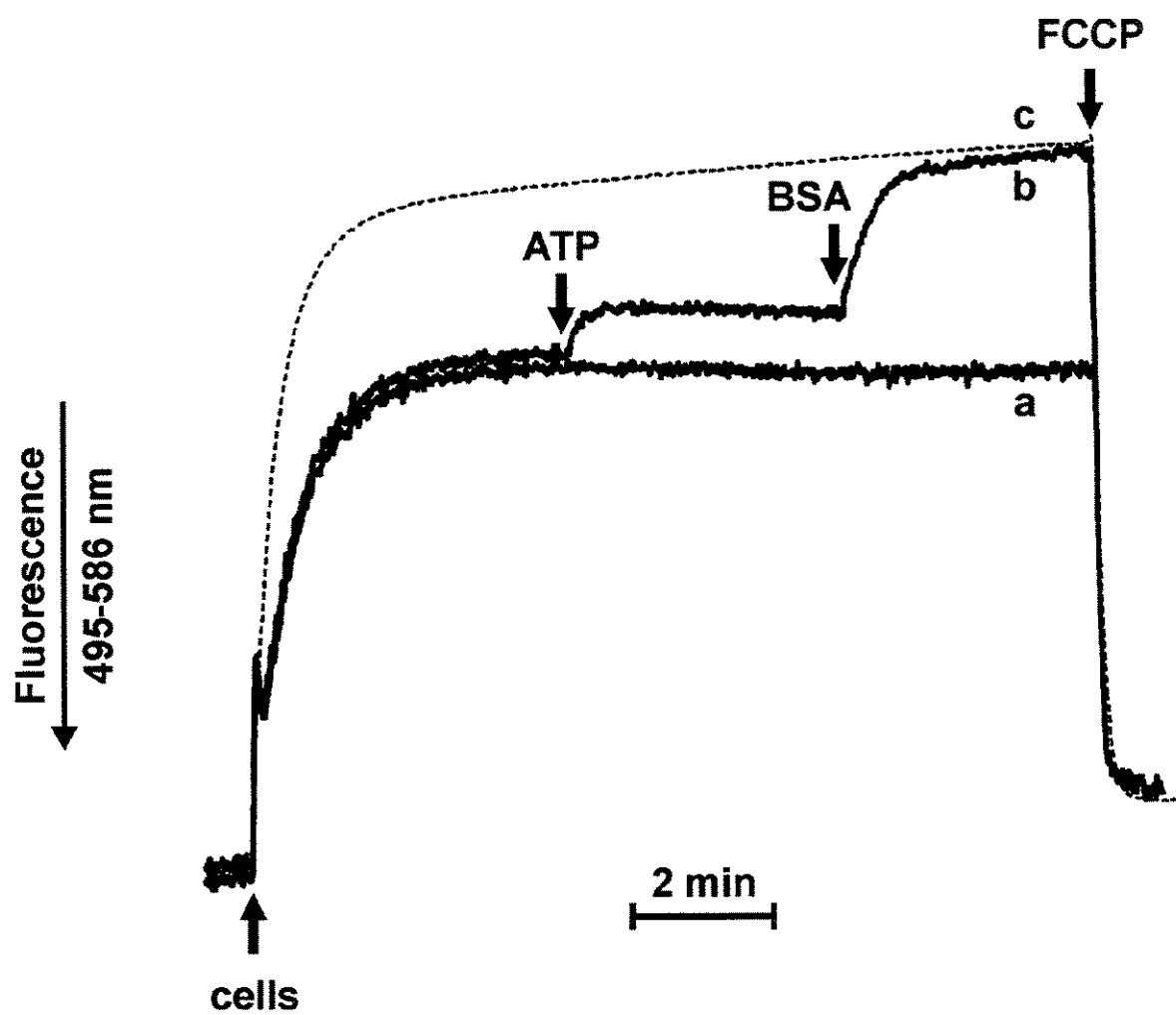


Figure 4

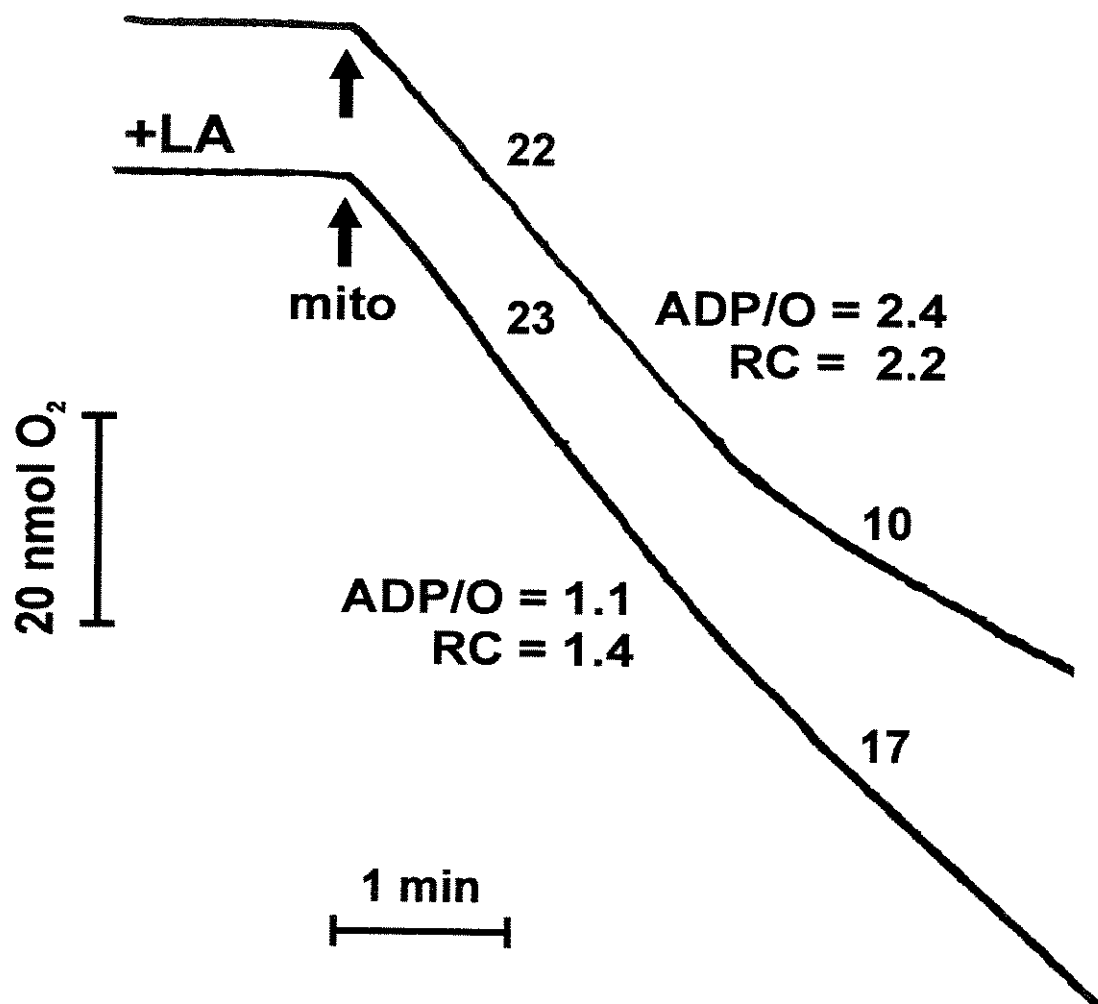


Figure 5

