

VALÉRIA CRISTINA FAUSTINONI

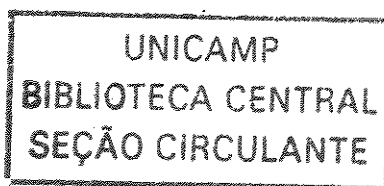
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **VALÉRIA CRISTINA FAUSTINONI**.
Campinas, 17 de Agosto de 2004.


Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber
Orientador(a)

**Expressão da proteína desacopladora (UCP) em
Candida parapsilosis ATCC 22019 em diferentes fases da curva
de crescimento e sob a ação de drogas antifúngicas**

CAMPINAS

2004



VALÉRIA CRISTINA FAUSTINONI

**Expressão da proteína desacopladora (ÚCP) em
Candida parapsilosis ATCC 22019 em diferentes fases da curva
de crescimento e sob a ação de drogas antifúngicas**

*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. JIRI BORECKÝ

CAMPINAS

2004

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA F275e
 V EX
 TOMBO 61980
 PROJ. 16.R 0086.05
 PREÇO 11,00
 DATA 10/02/05
 Nº CPD 1

bibid: 341378

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

F275e Faustinoni, Valéria Cristina
 Expressão da proteína desacopladora (UCP) em Cândia parapirosis
 ATCC 22019 em diferentes fases da curva de crescimento e sob a ação
 de drogas antifúngicas / Valéria Cristina Fantinoni. Campinas, SP :
 [s.n.], 2004.

Orientador : Angélica Zaninelli Schreiber, Jiri Borecký
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Candiíase. 2. Metabolismo - Energia. I. Angélica Zaninelli
 Schreiber. II. Jiri Borecký. III. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado

Orientador(a):

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber _____

Membros:

Profa. Dra. Agueda Cleofe Marques Zaratin _____

Profa. Dra. Márcia Marília Fagian _____

Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes _____

Profa Dra. Lúcia Nassi Castilho _____

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

Data: 17/08/2004

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Bento, com orgulho, pelo grande incentivo e presença constante.

À minha mãe, Vera, exemplo de amor, carinho e dedicação.

A minha irmã, Cláudia, com amor, respeito e admiração.

Ao meu irmão, Frederico, com amor e carinho.

À Deus, pela constante grandiosidade a nos desafiar e nos mostrar novos horizontes.

À Professora Dra. Angélica Zaninelli Schreiber pela orientação, credibilidade, ensino e oportunidade.

Ao Dr. Jiri Borecký pela co-orientação, ajuda e dedicação

Ao Professor Dr. Aníbal E. Vercesi do Laboratório de Bioenergética.

Aos amigos e pós-graduandos, em especial à Renata pela amizade construída no decorrer dos anos.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC-UNICAMP: Belmira, Cidinha, Denise, Flor, Jandira, Marcel, Maria Rita, Marizete, Odair, Patrícia, Simone, Silvio, Wagner e em especial à Ana Beatriz A.Teixeira, Luzia Lyra e Edson Luz.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular – CBMEG – UNICAMP, pelas risadas a animar constantemente o ambiente.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Bioenergética, pelas inúmeras colaborações.

Ao meu namorado, Marco Antônio com amor, pela paciência e compreensão.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável, para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

	PÁG.
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1- INTRODUÇÃO	37
1.1- Conceitos gerais sobre os fungos.....	39
1.2- Aspectos clínicos e epidemiológicos.....	42
1.3- Tratamento e profilaxia.....	44
1.4- Cadeia respiratória.....	48
1.5- Proteínas desacopladoras.....	50
1.5.1- Características estruturais da UCP.....	50
1.5.2- Mecanismos de desacoplamento das UCPs.....	50
1.5.3- As UCPs.....	52
2- OBJETIVOS	55
3- MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1- Estudo retrospectivo de prevalência.....	61
3.2- Microrganismo avaliado.....	61
3.2.1- Manutenção da linhagem de estudo.....	61
3.2.2- Meios de cultura.....	61
3.2.3- Reativação das cepas para estudo.....	62
3.3- Agentes Antifúngicos.....	62

3.4- Avaliação do crescimento da levedura.....	62
3.4.1- Preparação do pré-inóculo.....	62
3.4.2- Preparação do inóculo.....	62
3.4.3- Obtenção das curvas de crescimento.....	63
3.4.4- Expressão da proteína desacopladora (UCP) durante o crescimento da cultura <i>C parapsilosis</i>	63
3.4.5- Determinação do início da fase exponencial de crescimento e tempo de crescimento.....	64
3.5- Dosagem de proteínas.....	64
3.6- Obtenção de esferoplastos.....	64
3.6.1- Curva de permeabilização.....	64
3.6.2- Preparação de esferoplastos.....	65
3.7- Isolamento de mitocôndria.....	65
3.8- Proteína preparada pelo método de trizol.....	66
3.8.1- Eletroforese de proteínas.....	66
3.9- Imunodeteção da CpUCP.....	66
3.10- Extração do RNA total de <i>C. parapsilosis</i>	67
3.10.1- Eletroforese do RNA.....	67
3.10.2- RNA-blot.....	67
3.11- Avaliações bioquímicas.....	68
3.11.1- Meio de reação padrão.....	68
3.11.2- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial.....	68
3.12- RT-PCR transcrição reversa com PCR.....	68

3.13- Extração do DNA genômico pelo método de trizol.....	69
3.13.1- Extração do DNA por CTAB.....	69
3.13.2- DNA-blot.....	70
4- RESULTADOS.....	71
5- DISCUSSÃO.....	93
6- CONCLUSÕES.....	103
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
8- ANEXOS.....	121
Anexo 1- Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. parapsilosis</i> em meio YEPG.....	123
Anexo 2 – Dados de leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células de <i>C. parapsilosis</i> as 12, 16 e 36 horas feita com drogas e suas respectivas concentrações em meio YEPG.....	125
Anexo 3 – Trabalho completo submetido para publicação na revista Antimicrobiol Agents of Chemotherapy: <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 uncoupling protein as a possible target involved in Ketoconazole and Fluconazole mechanism of action.....	127
Anexo 4 – Trabalho aceito para publicação na revista Bras. J. Med. Biol Res. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in <i>Candida albicans</i>	143

LISTA DE ABREVIATURAS

	Inglês	Português
AA	Antimycin A	Antimicina A
ADP	Adenosine diphosphate	Adenosina difosfato
AOX	Alternative oxidase	Oxidase alternativa
AMB	Amphotericin B	Anfotericina B
ASD	Agar Sabraud dextrose	Ágar Sabraud dextrose
ATCC	American type culture collection	-
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosina trifosfato
BAT	Brown-adipose tissue	Tecido adiposo marrom
BHI	Brain heart infusion	Infusão de cérebro coração
BSA	Bovine serum albumin	Albumina bovina sérica
BMCP	Brain mitochondrial carrier protein	Proteína carreadora mitocondrial de cérebro
CpUCP	<i>C. parapsilosis</i> uncoupling protein	Proteína desacopladora de <i>C. parapsilosis</i>
CAT	Carboxyatractylósido	Carboxiatractilósideo
CIM	Minimal inhibitory concentrations	Concentração inibitória mínima
CRC	Cytochrome respiratory chain	Cadeia respiratória de citocromos
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7]decane}-4-yl) phenylphosphate	-
$\Delta\Psi$	Mitochondrial membrane potential	Potencial de membrana mitocondrial
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Pirocarbonato de dietil
DO	Optics density	Densidade óptica
DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
EGTA	-	Ácido etileno glycol-bis (β-aminoetil éter) N,N,N',N' tetra acético

EST	“expressed sequence tag”	-
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxylhydrazone	-
FFA	Free fatty acid	Ácidos graxos livres
GMP	- Guanosine 5-Monophosphate	Guanosina monofosfato
$\Delta\mu_H^+$	Proton electrochemical gradient	Gradiente eletroquímico de prótons
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	-
ITCZ	Itraconazole	Itraconazol
KCl	Potassium chloride	Cloreto de potássio
NADH	-	Nicotina adenosina fosfato dinucleotídeo reduzido
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory	-
ORF	Open reading frame	Leitura de seqüências abertas
PAR	Parallel respiratory chain	Cadeia respiratória paralela
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	-
PUMP	Plant uncoupling mitochondrial protein	Proteína mitocondrial desacopladora em planta
ROS	Reactive oxygen species	Espécie reativa de oxigênio
TMO	Bone marrow transplant	Transplante de medula óssea
UCP	Uncoupling protein	Proteína desacopladora
RT PCR	transcription reverse polimerase chain reation	Transcrição reversa reação em cadeia de polimerase
SSC	Sodium salt citrate	Sal de citrato de sódio

	PÁG.
Tabela1- Distribuição das cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	75

	PÁG.
Figura 1- Curva de crescimento dos fungos.....	40
Figura 2- Cadeia respiratória dos fungos.....	49
Figura 3- Dois possíveis mecanismos de ação da proteína desacopladora.....	50
Figura 4- Porcentagem de isolamento de cepa de <i>C. parapsilosis</i>	73
Figura 5- Relação entre cepas isoladas e pacientes avaliados.....	73
Figura 6- Porcentagem de cepas de <i>Candida parapsilosis</i>	74
Figura 7- Porcentagem de isolamento de cepas de <i>Candida parapsilosis</i> a partir de diferentes espécimes clínicos.....	74
Figura 8- Curva de crescimento de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	76
Figura 9- Monitoramento da permeabilização de células de <i>C. parapsilosis</i> .	76
Figura 10- Diminuição do potencial mitocondrial.....	77
Figura 11a- Immunoblot de CpUCP em mitocôndria de <i>C. parapsilosis</i>	78
Figura 11b- Immunoblot de CpUCP em esferoplastos de <i>C. parapsilosis</i>	78
Figura 12- Perfil de expressão da CpUCP durante o crescimento.....	79
Figura 13a- Expressão da CpUCP na presença de fluconazol.....	80
Figura 13b- Immunodeteção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 h, na ausência e presença de- fluconazol.....	80
Figura 14a- Expressão da CpUCP na presença de cetoconazol.....	81
Figura 14b- Immunodeteção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 h, na ausência e presença de cetoconazol.....	81
Figura 15a- Expressão da CpUCP na presença de itraconazol.....	82

Figura 15b-	Imunodeteção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 h, na ausência e presença de itraconazol.....	82
Figura 16a-	Expressão da CpUCP na presença de anfotericina.....	83
Figura 16b-	Imunodeteção do acúmulo de CpUCP às 12, 16e 36 h, na ausência e presença de anfotericina.....	83
Figura 17-	Alinhamento das seqüências das proteínas desacopladoras de animais, plantas e transportadores de M2Oms.....	86
Figura 18-	Alinhamento das proteínas de 28 UCPs/PUMPs e 7 M2Oms.....	88
Figura 19-	Eletroforese em gel de 1% de agarose de duas frações do RNA total.....	89
Figura 20-	Eletroforese do RNA total extraído das células de <i>C. parapsilosis</i>	91

RESUMO

Diversos quimioterápicos utilizados contra espécies de *Candida*, apresentam baixa especificidade e toxicidade. O alarmante relato de resistência clínica e microbiológica de drogas antifúngicas tem sido atribuído à presença da cadeia respiratória do metabolismo de energia de *Candida*. Recentemente, uma proteína desacopladora foi descoberta em *Candida parapsilosis*. As proteínas desacopladoras estão associadas frequentemente com a proteção celular contra estresse oxidativo, limitando a super produção de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, para melhor entendimento do metabolismo de energia dos fungos, novos alvos biológicos podem ser explorados sendo um excelente caminho de pesquisa para desenvolvimento de terapias. Neste trabalho, nós relatamos um perfil de acúmulo de CpUCP durante as diferentes fases de crescimento da cultura de *Candida parapsilosis* em meio YEPG. Células de *Candida* iniciaram o acúmulo de CpUCP depois da velocidade máxima de crescimento. Entretanto, na presença de concentrações sub-inibitórias dos agentes antifúngicos cetoconazol e fluconazol, o acúmulo de CpUCP foi considerado inibitório. Nossos resultados sugerem que a CpUCP pode ser um novo alvo para drogas antifúngicas que juntamente com inibidores da oxidase alternativa pode solucionar a necessidade de encontrar novos e potentes medicamentos contra candidiases sistêmicas.

ABSTRACT

Current chemotherapy against *Candida* species suffers a number of deficiencies, as low specificity and toxicity. Moreover, there is an alarming increase in reports of microbiological and clinical drug resistances that have been attributed to the presence of branched respiratory pathways in *Candida* energy metabolism. Recently, an uncoupling protein was discovered in this pathogenic yeast. Uncoupling proteins are also associated frequently with cell protection against oxidative stresses, limiting the overproduction of reactive oxygen species. Thus, better understanding of the fungal energy metabolism could be an excellent way to search for new biological targets that could be exploited for the rational development of improved therapies. Here we report a CpUCP accumulation profile during different *Candida parapsilosis* culture growth stages in YEPG medium. CpUCP began to accumulate in *Candida* cells after the culture passed the maximal growth rate. However, in the presence of subinhibitory concentrations of the azolic antifungal agents ketoconazole and fluconazole the CpUCP accumulation was considerably inhibited. Our results suggest that CpUCP may be a new target for antifungic drugs that together with inhibitors of alternative oxidase can resolve the alarming necessity to find new and potent medicaments against systemic candidiases.

1- INTRODUÇÃO

1.1- CONCEITOS GERAIS SOBRE OS 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 e possuem membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. Em 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. Estes últimos, por sua vez, apresentam duas estruturas morfológicas distintas: filamentosa e leveduriforme.

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 (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

O tempo de geração das leveduras varia dentre os diferentes gêneros e até entre espécies de um mesmo gênero, na 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).

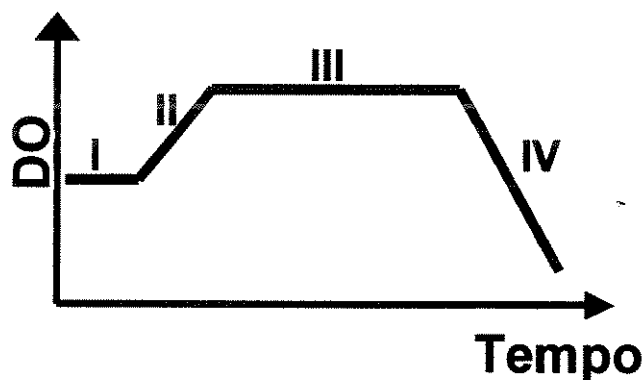


Figura 1- (I) fase Lag também conhecida como fase de adaptação ou latência, é o período em que a população se adapta ao meio em que se encontra, iniciando a produção de metabólitos essenciais para o seu desenvolvimento; (II) fase exponencial ou logarítmica é a fase na qual a multiplicação ocorre com 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 serem hialinas, coloridas ou pretas (pela pigmentação produzida na presença de melanina).

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

Embora existam 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).

O gênero *Candida* inclui várias espécies, que podem ser patogênicas para os seres humanos (SMITH et al., 1987). As leveduras deste gênero 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).

Casos de endocardite, endoftalmite e afinidade por tecidos traumatizados têm sido constantemente atribuídos a cepas de *C. parapsilosis* (DARWAZAH et al., 1999). Essa levedura vem se tornando um patógeno importante em infecções hospitalares, sendo principalmente veiculada pelas mãos dos profissionais de saúde (HUANG et al., 1998, LEVIN et al., 1998). A *C. parapsilosis* é reconhecida como um importante agente causal de candidemia em unidades de tratamento intensivo neonatal (HUANG et al., 2000).

Essas leveduras aeróbias possuem aspectos metabólicos oxidativos e genéticos interessantes, visto que possuem DNA linear, curto e com organização original (CAMOUGRAND et al., 1988; KOVAC et al., 1984).

A levedura *Candida parapsilosis* é dependente do metabolismo oxidativo para o seu crescimento visto que a via fermentativa foi perdida nesta levedura. Ela é, entretanto, capaz de crescer em altas concentrações de glicose e em meios suplementados com antimicina A ou drogas com ação na síntese de proteínas mitocondriais. Além da cadeia respiratória normal, a *Candida parapsilosis* desenvolveu uma segunda cadeia de transporte de elétrons insensível à antimicina A que permite a oxidação de NAD(P)H citoplasmático através de uma via alternativa descrita em numerosas plantas e microrganismos (CAMOUGRAND et al., 1991).

1.2- ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

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 frequência 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).

Em um estudo realizado por REAGAN et al. (1990), entre pacientes com malignidades hematológicas e submetidas 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 venoso central predispõe pacientes neutropênicos a fungemia, especialmente aqueles que estão recebendo nutrição parenteral (SCHMID et al., 1995).

Segundo TRABASSO (2001), dentre os 115 pacientes submetidos a transplante de medula óssea de janeiro de 1997 a dezembro de 1999 no HC da UNICAMP, 21,7% foram a óbito, sendo um dos fatores relacionados, as infecções fúngicas. As espécies de *Candida* representaram 62,5% das etiologias, sendo que *C. parapsilosis* foi responsável por 60% das candidemias diagnosticadas.

Nos anos de 1996 a 2002, 294 casos de candidemia hospitalar foram identificados (Hospital da Arábia Saudita) sendo 176 (59.9%) em UTI, 32 (10.9%) serviço médico, 30 (10.2%) cirurgia, 24 (8%) em pacientes com malignidade hematológica e 15 (5%) na pediatria. As espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* 149 (50.7%), seguida de *C. tropicalis* 61 (20.7%), *C. parapsilosis* 32 (10.9%), *C. krusei* 23 (7.8%) e *C. glabrata* 21 (7.1%) (Al-JASSER et al., 2002).

Durante 12 meses, março 1999 a março 2000, GODOY et al. (2003), estudaram um total de 103 espécies de *Candida* isoladas da corrente sanguínea, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada (42%), e das espécies não *albicans*, seguida por *C. tropicalis* (24.2%) e *C. parapsilosis* (21.3%).

Estudos retrospectivos realizados na Suécia Central, de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, em um total de 191 casos relatados, foram identificados 128 casos (67%) de *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* em 30 (15.7%) e *C. parapsilosis* em 14 (7.3%). Os fatores de risco mais prevalentes dentre os pacientes dos quais foram isoladas espécies não *C. albicans* foram, malignidades hematológicas (56%), cirurgia (50%), e internação em UTI (19%) (KLINGSPOR et al., 2004).

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).

No Brasil estudo realizado por COLOMBO et al. (1999) relatou 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 venoso 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).

A tolerância aos antifúngicos 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 em algumas espécies de *Candida*.

1.3- TRATAMENTO E PROFILAXIA

O tratamento das infecções fúngicas é limitado devido às escassas opções terapêuticas, falhas na resposta clínica, resistência à terapia e toxicidade das drogas disponíveis (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- flurocitosina (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 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 ao fato da 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: o posaconazol, o ravuconazol e o voriconazol (SANGULARD et al., 1999).

A profilaxia antifúngica é obrigatória em pacientes submetidos a TMO, pois a incidência desta colonização por espécies de *Candida* nestes pacientes corresponde a 76%. O patógeno pode ganhar a corrente sanguínea 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).

Colombo et al. (2003), avaliaram o perfil de susceptibilidade antifúngica em 200 espécies de *Candida* isoladas da corrente sanguínea obtidas de pacientes de 5 hospitais terciários no Brasil. A suscetibilidade antifúngica foi avaliada pelo método de NCCLS. As espécies mais frequentes foram: *C. albicans* (41,5%), seguida de *C. tropicalis* (24%), e *C. parapsilosis* (20,5%). Resistência a AMB foi observada em 2,5% dos isolados (duas espécies *C. albicans*, duas espécies de *C. parapsilosis* e uma espécie de *C. Krusei*) com concentração inibitória mínima (CIM) ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$.

A frequência dos isolados e a suscetibilidade a antifúngicos foram avaliados em 218 espécies de *Candida* isoladas da corrente sanguínea de 1996 a 2001. Todos os 41,7% das candidemias foram devido a *C. albicans* seguido de *C. parapsilosis* (22%). Utilizando o método NCCLS-M27, 48 cepas de *C. parapsilosis* foram avaliadas quanto a suscetibilidade frente a fluconazol (sensibilidade (S): ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$; dose sensível dependente (DSD): 16-32 $\mu\text{g/ml}$, e resistente (R): ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. Para itraconazol, (S): $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$; (DSD): 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$, e resistente (R): ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$. Para 5-flucitosina (S): ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$; (DSD): 8-16 $\mu\text{g/ml}$, e (R): ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. O fluconazol mostrou boa atividade inibindo 100 % das espécies de *C. parapsilosis* com um MIC ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, para voriconazol CIM ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ e para itraconazol $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$. Frente a 5-flucitosina apenas uma cepa de *C. parapsilosis* mostrou-se resistente com CIM > 128 $\mu\text{g/ml}$. Outra droga avaliada foi a anidulafungin, que inibiu todas as espécies de *Candida* com CIM $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, exceto *C. parapsilosis* que teve CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ (MARCO et al., 2003).

De março de 1999 a março de 2000, em 5 hospitais de 4 países da América Latina, foram coletadas um total de 103 espécies de *Candida* isoladas da corrente sanguínea, sendo a sensibilidade a antifúngicos avaliada pelo método NCCLS. Dentre os 58% de espécies não albicans, as espécies mais frequentes foram *C. tropicalis* (24,2%) e *C. parapsilosis* (21,3%). Avaliando-se o CIM₅₀ e o CIM₉₀ frente a 4 drogas (AMB, 5-flucitosina, Fluconazol e ITCZ), as cepas de *C. parapsilosis* foram sensíveis a todas as drogas testadas (GODOY et al., 2003).

Estudos retrospectivos de DURAN et al. (2003), investigaram a incidência de candidemia e suscetibilidade antifúngica das espécies de *Candida* isoladas de sangue, no período de Janeiro de 1997 a Dezembro de 2001. Concentração inibitória mínima (CIM) de AMB, fluconazol, itraconazol e flucitosina, foram determinadas utilizando o método de microdiluição em caldo para leveduras sensíveis para os 53 isolados detectados neste período: *C. parapsilosis* (22), *C. albicans* (19), *C. glabrata* (5), *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2). *C. parapsilosis* esteve presente em 41.5% dos casos em que estes isolados foram significativamente associados com UTI neonatal e pediátrica. Somente uma cepa de *C. parapsilosis* mostrou-se resistente a flucitosina (DURAN et al., 2003).

Estudos realizados por TAKAKURA et al. (2004), no Japão avaliaram a distribuição e a suscetibilidade de espécies de *Candida* em isolados de sangue. Em um ano de programa de vigilância, foram coletadas 535 espécies de *Candida* isoladas de sangue. A identificação das espécies foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo, descrito pelo NCCLS M27-A2, a suscetibilidade a 6 agentes antifúngicos, incluindo voriconazol e micafungin, foram realizados com leituras após 24 e 48 horas de incubação. A distribuição entre as espécies foi: 41% *C. albicans*, 23% *C. parapsilosis*, 18% *C. glabrata*, 12% *C. tropicalis* e 2% *C. krusei*. A concentração de fluconazol necessária para inibir 90% dos isolados para CIM₉₀ de 24/48 horas para *C. parapsilosis* foi de 0.5/2 mg/L e a porcentagem de resistência a fluconazol foi de 0.8% para *C. parapsilosis*. A droga micafungin foi ativa contra todas as espécies isoladas com CIM₉₀ de 0.03 mg/L, exceto para *C. parapsilosis* que apresentou CIM₉₀ de 2 mg/L.

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.

1.4- 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 enzima ATP sintetase para fosforilar ADP à ATP. Assim, é a cadeia respiratória que controla a energia do gradiente eletroquímico dos prótons (força protomotriz) necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa (LEHNINGER et al., 1995).

A levedura *Candida parapsilosis* apresenta características bioenergéticas muito peculiares. 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 microrganismos (HILL e DEGN, 1977; MOORE e SIEDOW, 1991) (figura 2).

Anteriormente, GUÉRIN et al., 1989 e CAMOUGRAND et al., em 1991 descreveram que a oxidação de substratos exógenos como NADH, NADPH e glicerol 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.

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 amital (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).

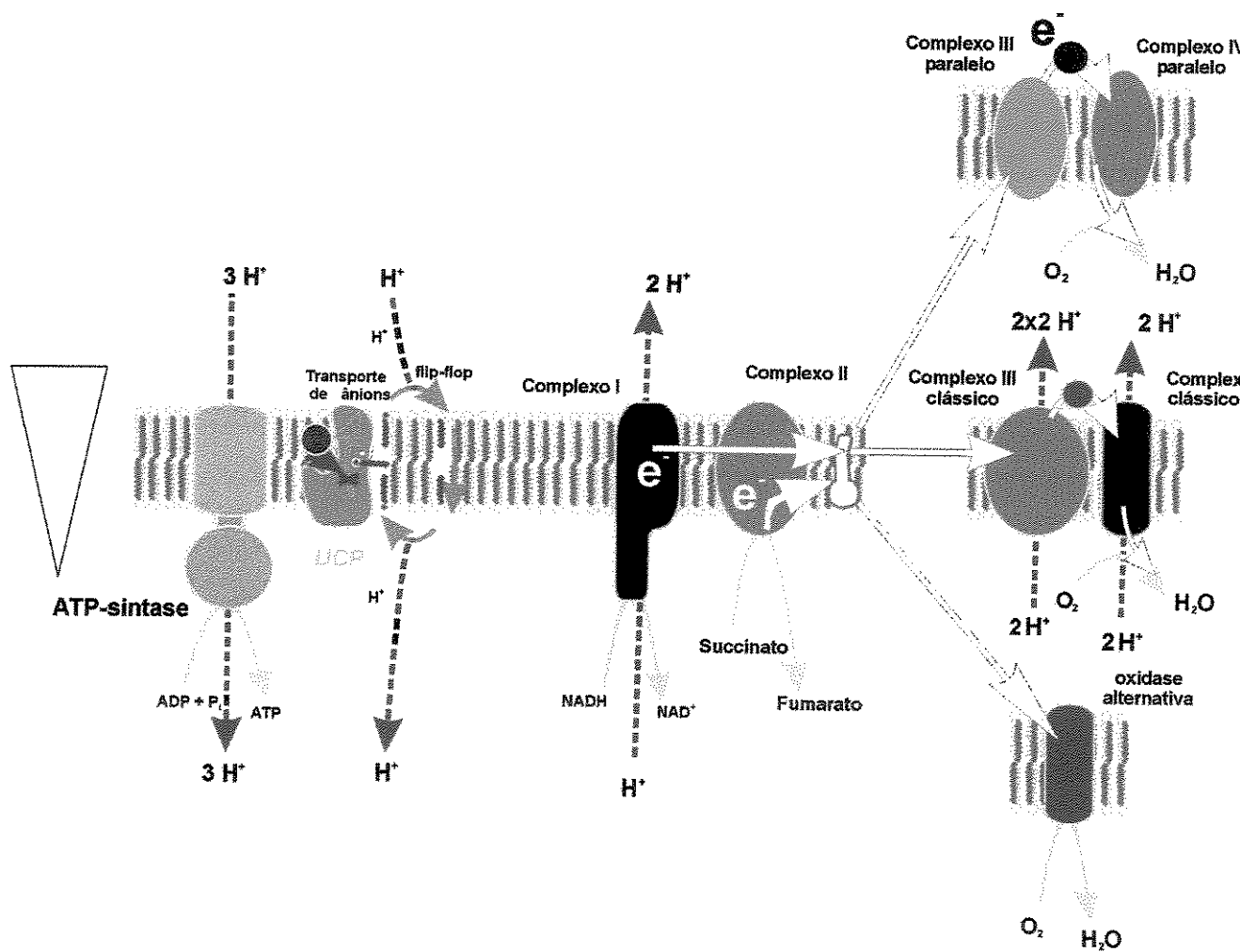


Figura 2- Cadeia respiratória dos fungos.

1.5- PROTEÍNAS DESACOPLADORAS

1.5.1- Características estruturais das proteínas desacopladoras (UCPs)

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 transporta 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 30kDa (LEHNINGER, 1995).

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

1.5.2- Mecanismos de desacoplamento das UCPs

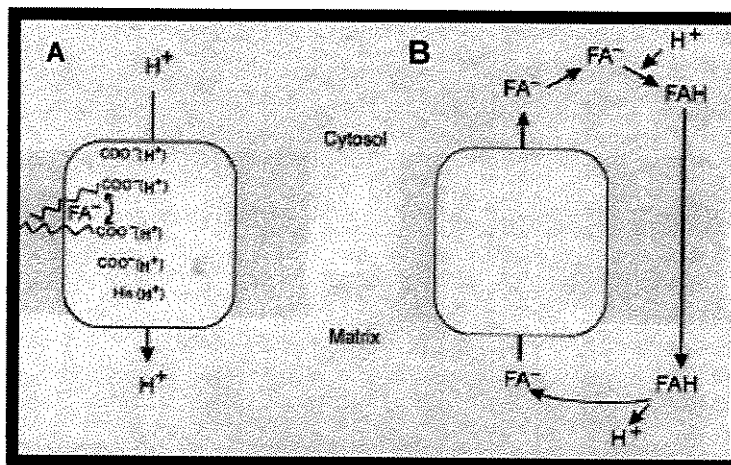


Figura 3- Dois possíveis mecanismos de ação da proteína desacopladora demonstrando o transporte de elétrons e a participação dos ácidos graxos (JARMUSZKIEWICZ, 2001).

Existem dois mecanismos que descrevem a recaptação de H^+ pela UCP. No primeiro modelo (figura 3. 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, 1990, a atividade da UCP é dependente da presença de ácidos graxos livres, e inibida por nucleotídeos de purina di- ou trifosfatados.

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, os 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 3.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.

1.5.3- As UCPs

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 O₂ 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 et al., 1983). 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 a UCP em plantas, (PUMP- plant uncoupling protein) foi demonstrada em mitocôndrias de batata (VERCESI et al., 1995) a qual foi denominada PUMP (proteína mitocondrial desacopladora de plantas). Recentemente foram identificados genes de PUMP em batata (LALOI et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (MAIA et al., 1998; WATANABE et al., 1999), *Symplocarpus foetidus* (ITO, 1999), trigo (MURAYAMA e HANDA, 2000) e arroz (WATANABE e HIRAI, 2001). O acoplamento da mitocôndria de *Candida parapsilosis* pela adição subsequente de ATP e BSA sugere que nas mitocôndrias da levedura *Candida parapsilosis* possa existir uma proteína desacopladora semelhante à encontrada em plantas (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000).

Assim, esta descoberta impulsionou a procura por UCPs em organismos mais simples, como amebas e fungos (JARMUSZKIEWICZ et al., 1999, JARMUSZKIEWICZ 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 (JARMUSZKIEWICZ, 2002).

A CpUCP foi detectada em análise de Western blot como uma banda de 32 kDa pelo anticorpo policlonal produzido contra proteína desacopladora de batata (JEZEK et al., 1998) e/ou contra a PUMP de *Arabidopsis* (BORECKÝ et al., 2001). A respiração em mitocôndrias da *C. parapsilosis* depletadas de ácidos graxos endógenos é ativada pelo ácido linoléico e ao mesmo tempo o potencial eletroquímico de prótons decresce, sugerindo que na mitocôndria da *Candida parapsilosis* existe um fluxo de prótons sensível ao ácido graxo, semelhante aos fluxos observados em mitocôndrias de plantas ou mamíferos. A CpUCP é também inibida por nucleotídeos purinos (ATP, GDP) a nível correspondente das UCPs de plantas ou UCP2 de mamíferos ($K_i = \sim 1 \text{ mM}$) (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000).

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

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).

Embora a proteína desacopladora tenha sido detectada em *Candida parapsilosis*, nenhum gene codificando UCP em fungos foi descrito até então. Como o papel fisiológico das UCPs ainda não está completamente esclarecido, a caracterização e análise de novos genes, especialmente em um organismo patogênico ao homem e pertencente a um reino (Fungi) ainda pouco explorado pela biologia molecular, é de suma importância e aplicabilidade.

2- OBJETIVOS

Em vista do que foi estabelecido, este trabalho tem como objetivos:

- Atualizar o levantamento de incidência de *Candida parapsilosis* em pacientes atendidos no HC - Unicamp
- Avaliar a expressão da UCP de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 nos diferentes estágios da curva de crescimento
- Estudar a possível influência de antifúngicos na expressão da UCP de *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- Realizar um estudo piloto com vistas à identificação e clonagem do gene que codifica proteína desacopladora (UCP) de *Candida parapsilosis*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ESTUDO RETROSPECTIVO DE PREVALÊNCIA

Para esta avaliação foi realizado um estudo retrospectivo nos arquivos de rotina do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia-DPC-HC-Unicamp nos anos 1998 a 2002. Foram consideradas todas as cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de diferentes espécimes clínicos coletados de pacientes atendidos nas diferentes especialidades clínicas e cirúrgicas do HC-Unicamp.

3.2- MICRORGANISMO AVALIADO

Candida parapsilosis ATCC 22019, cepa padrão utilizada para controle de qualidade em testes de susceptibilidade a antifúngicos.

3.2.1- Manutenção da linhagem de estudo

A cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019, foi inoculada em ágar Sabouraud dextrose e mantida à temperatura ambiente. Antes dos experimentos a linhagem de estudo foi repicada em placa de Ágar Sabouraud dextrose (ASD) e incubada por 24 h a 36 °C.

3.2.2- 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 respectivamente: caldo infuso de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), Ágar Sabouraud dextrose (ASD) (SHIGEMATSU et al., 1982) e YEPG (extrato de levedura 1%, glicerol 2% e bactopectona 2%) (CAMOUGRAND, 1987).

3.2.3- Reativação das cepas para estudo

Uma porção de colônia do microrganismo foi transferida para um tubo contendo caldo BHI e incubado a 37 °C por 24 h. Depois uma alíquota do crescimento obtido foi semeada em estrias em uma placa de ASD, incubando novamente a 37 °C por 24 horas.

3.3- AGENTES ANTIFÚNGICOS

Os agentes antifúngicos utilizados neste trabalho foram: Anfotericina B (Sigma Aldrich A-4888), Fluconazol (Pfizer, Madrid, Espanha), Cetoconazol e Itraconazol (Janssen Farmacêutica), as drogas foram dissolvidas em DMSO (Merck) e armazenadas à -20 °C.

3.4- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA

3.4.1- Preparação do pré-inóculo

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

3.4.2- Preparação do inóculo

Após 24 h de incubação do pré-inóculo, foram transferidos, em média, 10 ml para erlenmeyer contendo 600 ml de meio de cultura (YEPG). O inóculo foi então incubado, sob agitação, 200 rpm, a 37 °C, pelo tempo determinado no item 3.4.5, necessário para que cada cultura da levedura atingisse sua fase exponencial de crescimento.

3.4.3- Obtenção das curvas de crescimento

O crescimento da cultura da levedura foi avaliado pelo aumento da massa total de células em culturas realizadas no meio líquido YEPG, monitorado por medidas de densidade óptica (DO). Amostras da cultura foram retiradas de hora em hora, medindo-se a densidade óptica em espectrofotômetro Hitachi U-3000 com comprimento de onda de 530 nm, utilizando meio de cultura como branco de reação.

Novas curvas de crescimento foram realizadas com adição prévia de concentrações de cada um destes agentes antifúngicos: 0,1 e 0,3 µg/ml de Anfotericina B, 2,0 e 3,0 µg/ml de Fluconazol, 0,015 e 0,03 µg/ml de Cetoconazol e 0,01 e 0,03 µg/ml de Itraconazol. A leitura da densidade óptica foi realizada às 12, 16 e 36 horas de crescimento da cultura.

3.4.4- Expressão da proteína desacopladora (UCP) durante o crescimento da cultura de *Candida parapsilosis*

Para obter quantidade suficiente de células nos vários estágios do crescimento foi monitorada relação entre DO₅₃₀ e o peso do sedimento celular. Através da DO₅₃₀ foi calculado o volume retirado para obter 100 mg de células em cada amostra. A relação entre DO₅₃₀ e o peso do pellet ficou linear, seguindo a equação $[Cp] = DO_{530} \times f$, onde $[Cp]$ é a concentração das células (g/l) e f é o fator correspondente a 1,33 g/l por DO₅₃₀ = 1.

Para monitorar a expressão do gene que codifica CpUCP, o RNA total foi isolado de 100 mg das células crescidas a 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 horas e 10 µg do RNA de cada tempo foram separados em um gel de agarose desnaturante (item 3.10.1) e transferidas para uma membrana de Nylon (Hybond N⁺). A quantidade do RNA total carregada no gel foi monitorada pela visualização do rRNA por brometo de etídeo.

3.4.5- 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 Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA.

3.5- 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 deoxicolato 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 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão. Outro método utilizado para dosagem da concentração final das proteínas, foi o método de Greenberg (GREENBERG e CRADDOCK, 1982).

3.6- OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS

3.6.1- Curva 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*, 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 observando que cerca de 90% das células converteram-se em esferoplastos.

3.6.2- Preparação de esferoplastos

As células de *Candida* obtidas no item 3.6.1 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 (1 M sorbitol, 1 M $MgCl_2$ e 50 mM Tris-HCl, pH 7,8). As células foram ressuspensas em tampão A (3 ml/g de células) contendo 30 mM 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 litcase (1 mg/g de células) e 1 mM DTT e incubadas a 30 °C. A digestão foi acompanhada em espectrofotômetro 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 item 3.5.

3.7- ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

A partir dos esferoplastos obtidos no item 3.6.2, o precipitado foi ressuspenso em tampão B1 (0,6 M manitol, 1 mM EGTA, 0,5% BSA, 0,5 M PMSF, 10 mM tris-HCl, pH 7.4). Os esferoplastos foram mecanicamente rompidos utilizando-se homogeneizador Dounce. Os restos celulares foram precipitados por centrifugação (10 min a 1000 xg). As mitocôndrias foram precipitadas do sobrenadante por centrifugação de 10 min a 10500 x g e lavadas com tampão B2 (0,6 M manitol, 1 mM EDTA, 1% BSA, 10 mM 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 item 3.5.

3.8- PROTEÍNA ISOLADA PELO MÉTODO DE TRIZOL

A proteína total foi isolada do sobrenadante obtido depois da precipitação do DNA com etanol (item 3.13). Após adição de 2 ml de isopropanol as proteínas foram precipitadas por 10 min a 30 °C e centrifugadas a 12000 x g a 4 °C por 10 min. O sedimento foi lavado 3 vezes com 0,3 M guanidina em etanol 95% e 1 vez com etanol (2 ml cada lavagem), durante cada ciclo o sedimento foi mantido por 20 min a 30 °C e centrifugado a 7500 x g a 4 °C por 5 min. O sedimento final foi secado e ressuspenso em 100 µl de 3% de SLS.

3.8.1- Eletroforese de proteínas

A qualidade da proteína foi monitorada pela eletroforese padrão (SDS-PAGE) em um gel de 12% de poliacrilamida (Minigel, BioRad). As amostras foram aplicadas no gel e separadas em condições de corrente constante de 12 mA por gel, por 1:30 hora. O eletroferograma foi visualizado com Coomassie Brilliant Blue R 250.

3.9- IMUNODETECÇÃO DA CpUCP

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para uma membrana de Nylon (Hybond N), através do aparelho de eletrotransferência tipo semi-seco ("Semi-Dry Blotting", Pharmacia) com corrente constante de 0,8 mA/cm² por 1 hora. A membrana foi bloqueada em tampão TBS-T (1,37 M NaCl, 226,8 mM KCl, 250 mM Tris, pH 7,4 e 0,1% Tween 20), contendo 10% de leite desnatado por 3 horas e incubada em novos 10 ml de TBS-T, 10% de leite desnatado e anticorpos primários anti-AtPUMP1 ou anti-StPUMP (diluição 1:1000 cada) por um período de 16 horas. O anticorpo foi retirado após 3 lavagens em TBS-T (10, 10 e 15 min) e a membrana incubada em TBS-T, 10% de leite desnatado e o 2º anticorpo (conjugado de anti-IgG de coelho com fosfatase alcalina, diluição 1:5000). Após a lavagem do anticorpo não ligado (3 vezes em TBS-T por 10, 10 e 15 min), a membrana foi equilibrada em tampão para fosfatase alcalina (100 mM NaCl, 100

mM Tris, pH 9,5 e 5 mM MgCl₂) por 5 min. A visualização luminescente foi efetuada com substrato CSPD (Tropix, diluição 1:2000) e visualizada após 5 min de incubação como autoradiografia com Hyper film MP (Amersham).

3.10- EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE *Candida parapsilosis*

Aproximadamente 100 mg de células coletadas foram maceradas em um almofariz por 10 -15 min na presença de nitrogênio líquido. O homogenato foi extraído por 750 µl de Trizol por 5-10 min a temperatura ambiente. Após acrescentar 200 µl de clorofórmio, a fase orgânica foi separada por centrifugação a 11.200 x g a 4 °C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo Eppendorf e o RNA foi precipitado por adição de 500 µl de isopropanol e incubado por 20 min a -20 °C.

O precipitado foi coletado por centrifugação de 11.200 x g a 4 °C por 10 min e lavado com 1 ml de etanol gelado 75%. O sedimento final foi secado até ficar transparente e foi ressuspenso em 20-50 µl de água DEPC.

3.10.1- Eletroforese do RNA

A qualidade do RNA total foi monitorada pela eletroforese em um gel de 1% de agarose (Gibco) contendo tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) em água tratada por DEPC. Amostras de 15 µg do RNA total foram misturadas com tampão de amostra para RNA (contendo brometo de etídio) e após aplicação no gel foram separadas por um campo de 60 V por volta de 1 h. O eletroferograma foi visualizado em luz UV e fotografado com uma câmara digital (Eagle Eye).

3.10.2- RNA-blot

Amostras contendo 10 µg do RNA total foram misturadas com tampão de amostra para o RNA, desnaturadas em 65 °C por 10 min e imediatamente resfriada no gelo por 2 min, aplicadas em gel de agarose em condições desnaturantes, em seguida foram separadas por um campo de 60 V por volta de 1 h. O gel foi lavado 2 vezes por 15 min

com solução SSC 10x (1,5 M NaCl e 0,15 M citrato de sódio). Após eletroforese, o RNA foi transferido para uma membrana de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) por microcapilaridade (SAMBROOK et al., 1989).

3.11- AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.11.1- Meio de reação padrão

O meio de incubação padrão a 28 °C continha: 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.2, 2,5 mM KH₂PO₄ e 1 mM MgCl₂.

3.11.2- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial

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 de 495 e 586 nm, respectivamente.

3.12- RT-PCR TRANSCRIÇÃO REVERSA COM PCR

Transcrição reversa foi feita com 5-50 µg de RNA total extraído de *C. parapsilosis* usando Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA) de acordo com as condições recomendadas (42 °C, 1 hora). PCR foi então realizada sob as seguintes condições: 94 °C por 3 min e 35 ciclos de 94 °C por 1 min, anelamento na faixa de 51-62 °C por 45 s, e alongamento a 72 °C por 1 min e 30 s. O produto de PCR foi isolado do gel de agarose por ConcertTM Rapid Gel Extraction System (Invitrogen, EUA) e clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega, EUA). O sequenciamento foi realizado com ABI PRISM 3700 DNA Sequencer usando os primers T7 (forward) e SP6 (reverso), e os dados foram analisados por PHRED-PHRAP package (<http://www.phrap.org/>). Busca por genes/proteínas similares foram feitas com programas BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) em banco de dados não redundantes no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.13- EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO PELO MÉTODO DE TRIZOL

O método de extração com Trizol permite extração de DNA, RNA e proteína da mesma amostra. Para extração do DNA as células coletadas foram maceradas em um almofariz na presença de nitrogênio líquido, e com 1 ml de Trizol o homogenato foi extraído. Após centrifugação a 2000 x g a 4 °C por 5 min, a fase orgânica foi separada. O DNA foi precipitado por adição de 300 µl de etanol 100% e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente.

Após centrifugação a 2000 x g a 4 °C por 5 min, o sedimento foi incubado 2 vezes (30 e 30 min) a temperatura ambiente e lavado com 1 ml de solução 0,1 M citrato de sódio em etanol 10% e mais uma vez foi incubado por 10 min e lavado com 2 ml de etanol 75%. A cada ciclo, a amostra era centrifugada a 2000 x g a 4 °C por 5 min. O sedimento final foi secado e ressuspenso em 200 µl de 8 mM NaOH.

3.13.1- Extração do DNA por CTAB

Aproximadamente 1 g de células foram coletadas e maceradas em um almofariz na presença de nitrogênio líquido. Após adição de 4 ml de solução de extração CTAB (2% de CTAB, 100 mM Tris pH 8,0, 20 mM EDTA e 1,4 M NaCl) com 80 µl de 2-ME (β-mercaptoetanol) a amostra foi incubada por 1 h a 65 °C. Na amostra foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e a mistura centrifugada a 7500 x g a 4 °C por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado-se 1/10 do volume da solução CTAB/NaCl (10% CTAB em 0,7 M NaCl) acrescentando um volume equivalente de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1. Após centrifugação a 7500 x g a 4 °C por 5 min a fase aquosa foi retirada e nela adicionado 1 volume da solução de precipitação CTAB (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8,0 e 10 mM EDTA) e foi incubada por 30 min a 65 °C e centrifugada a 500 x g a 4 °C por 5 min.

O sedimento foi ressuspenso em 800 µl TE-NaCl (10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM EDTA e 1 M NaCl) e o DNA foi precipitado por adição do mesmo volume de isopropanol. Após centrifugar a 7500 x g a 4 °C por 15 min, o sedimento foi lavado com 700 µl de etanol 80%. O sedimento final foi secado e ressuspenso em 50 µl de 10 mM Tris, pH 8,0.

3.13.2- DNA-blot

Amostras de 20 µl contendo 5 µg de DNA, foram digeridas com restrições selecionadas para cortar 0 ou 1 vez o gene de interesse. Após 4 horas de digestão mais 4 µl de cada enzima foi adicionada e incubada por um período de 16 horas. O DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e foi separado por um campo de 60 V por volta de 2 h. O eletroferograma foi visualizado em luz UV e fotografado com uma câmara digital (Eagle Eye). Após eletroforese, o gel foi lavado em água destilada e incubado em solução 0,25 M de HCl por 30 min a temperatura ambiente, resultando na depurinação parcial dos fragmentos do DNA. Depois foi incubado consecutivamente em soluções de desnaturação por (2 x 20 min), e de neutralização por (2 x 20 min), a cada passo o gel era lavado com água destilada. O DNA foi transferido para uma membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham) por microcapilaridade (SAMBROOK et al., 1989).

4- RESULTADOS

Os dados obtidos dos estudos retrospectivos sobre a incidência e isolamento de cepas de *Candida parapsilosis* a partir de espécimes clínicos, podem ser observadas nas figuras de 4 a 7 e tabela 1.

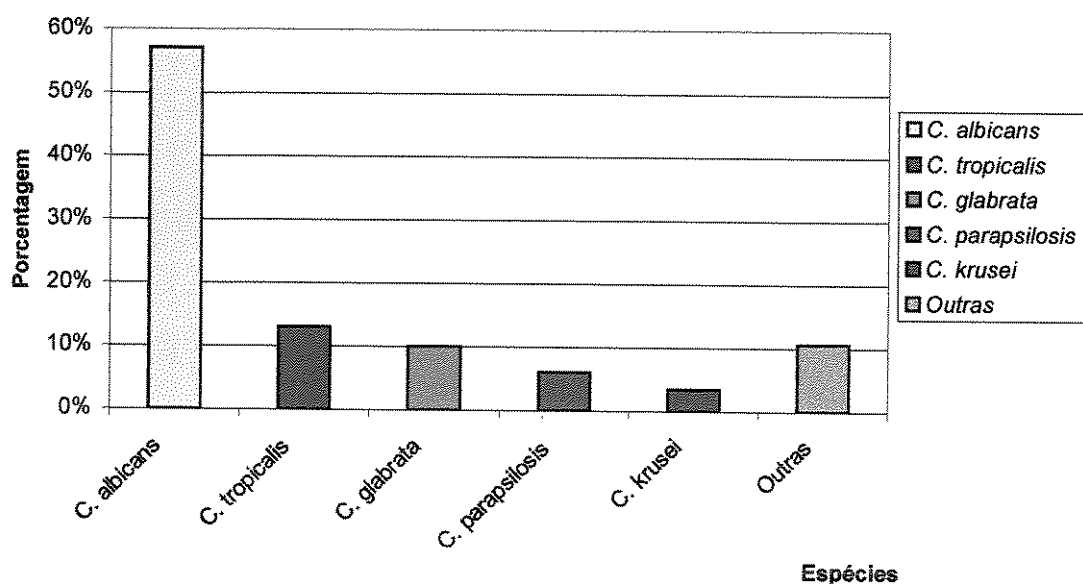


Figura 4- Porcentagem de isolamento de cepas de *C. parapsilosis* em relação às outras espécies nos anos de 2001 a 2003.

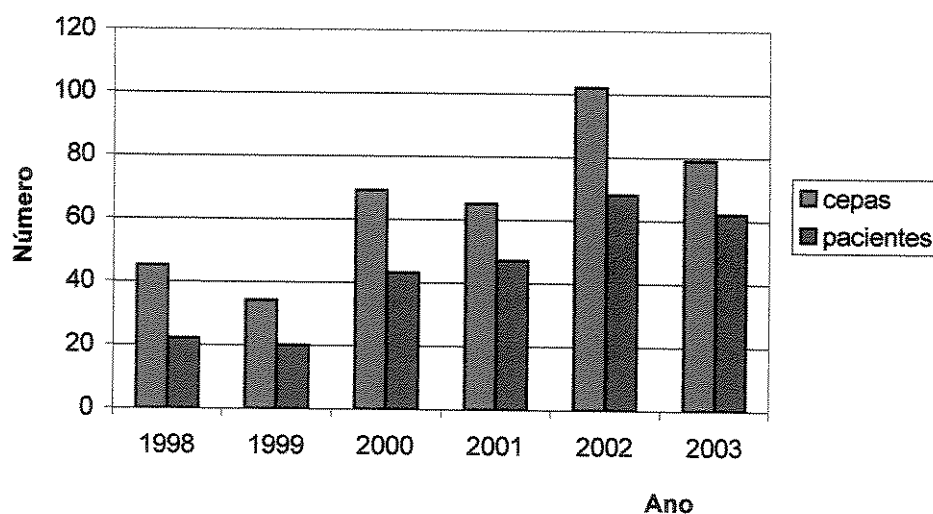


Figura 5- Relação entre número de cepas isoladas e pacientes avaliados quanto ao isolamento de *Candida parapsilosis* no HC – Unicamp de 1998 a 2003.

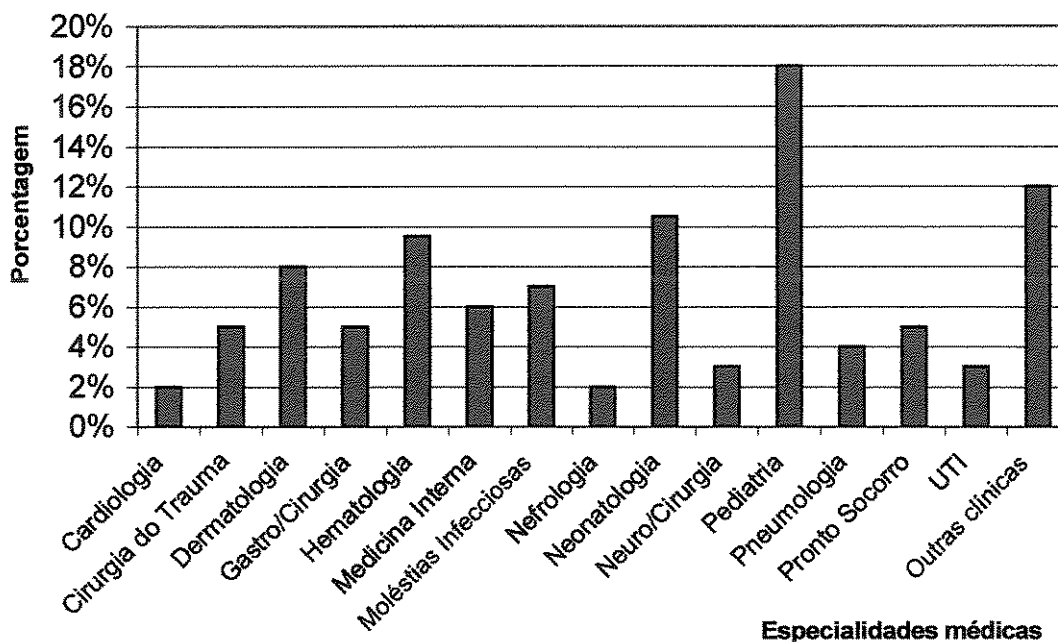


Figura 6- Porcentagem de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas a partir de espécimes clínicos de pacientes atendidos por diferentes especialidades médicas do HC-Unicamp no período de 1998-2002.

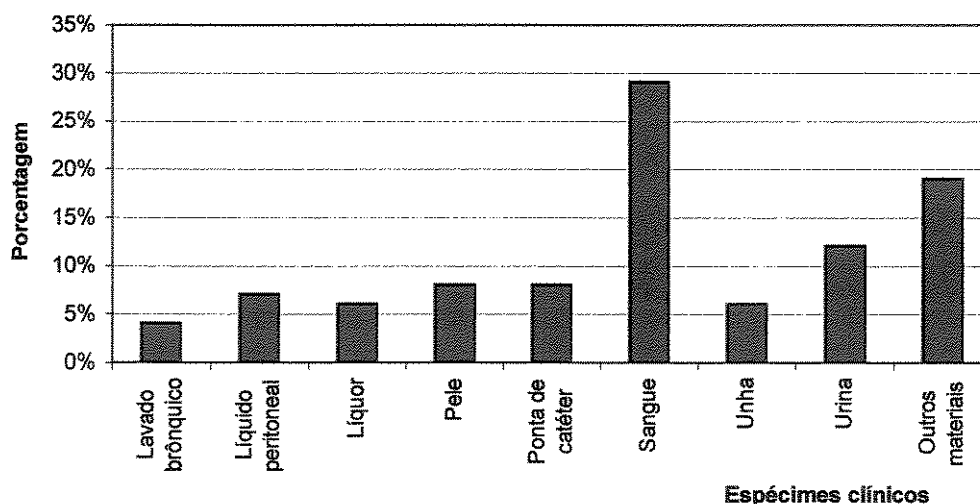


Figura 7- Porcentagem de isolamento de cepas de *Candida parapsilosis* a partir de diferentes espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-Unicamp no período de 1998-2002.

Tabela 1- Distribuição das cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de diferentes espécimes clínicos coletados de 200 pacientes, de diferentes especialidades médicas no HC-Unicamp, no período de 1998-2002.

Especialidades médicas	Espécimes clínicos							
	Lavado brônquico	Líquor	Líquido peritoneal	Ponta de cateter	Pele	Raspado de unha	Sangue	Urina
Cardiologia	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	4(4,5%)	2(5,5%)
Cirurgia do Trauma	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(8,0%)	0(0%)	0(0%)	12(13,5%)	1(2,5%)
Dermato	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	6(25%)	17(95%)	0(0%)	0(0%)
Gastro/cirurgia	0(0%)	0(0%)	0(0%)	4(15%)	0(0%)	0(0%)	9(10%)	2(5,5%)
Hematologia	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(8%)	0(0%)	0(0%)	13(14,5%)	2(5,5%)
Medicina Interna	0(0%)	1(5,5%)	0(0%)	3(11,5%)	1(4,0%)	0(0%)	4(4,5%)	4(11%)
Moléstias Infecciosas	1(7,5%)	3(17%)	0(0%)	4(15%)	2(8,0%)	0(0%)	5(5,5%)	2(5,5%)
Nefrologia	0(0%)	0(0%)	1(5,0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(1,0%)	3(8,0%)
Neonatologia	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(4,0%)	12(50%)*	0(0%)	5(5,5%)	9(24,5%)
Neuro/cirurgia	0(0%)	4(22%)	0(0%)	2(8,0%)	0(0%)	0(0%)	3(3,5%)	1(2,5%)
Pediatria	1(7,5%)	6(33%)	17(81%)	3(11,5%)	1(4,0%)	0(0%)	18(20%)	6(16%)
Pneumologia	8(62%)	1(5,5%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Pronto Socorro	0(0%)	2(11%)	3(14%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(2,0%)	1(2,5%)
UTI	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(8,0%)	0(0%)	0(0%)	9(10%)	0(0%)
Outras	3(23%)	1(5,5%)	0(0%)	3(11,5%)	2(8,0%)	1(5,0%)	5(5,5%)	4(1,3%)
Total	13	18	21	26	24	18	90	37

*Avaliação de contaminação de mãos do "Staff" da neonatologia para pesquisa de surto de infecção hospitalar.

A curva de crescimento foi realizada no meio YEPG. Os dados brutos que deram origem à curva, podem ser visualizados no anexo 1.

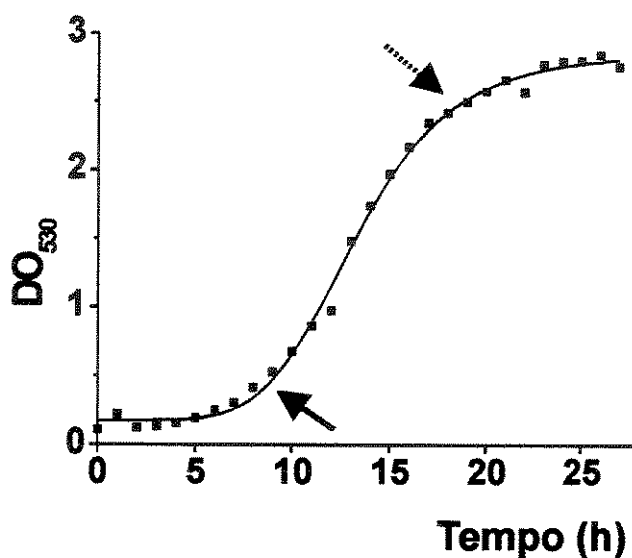


Figura 8- Curva de crescimento de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em meio YEPG. A seta contínua indica o início da fase exponencial que corresponde a 8:54h de incubação e a seta tracejada indica o tempo de crescimento máximo que corresponde a 18:31h.

Esferoplastos foram preparados a partir de células com 16 h de crescimento em meio YEPG e a eficiência da permeabilização das células, foi monitorada pela diminuição de espalhamento de luz a 530 nm por 1 hora (Figura 9).

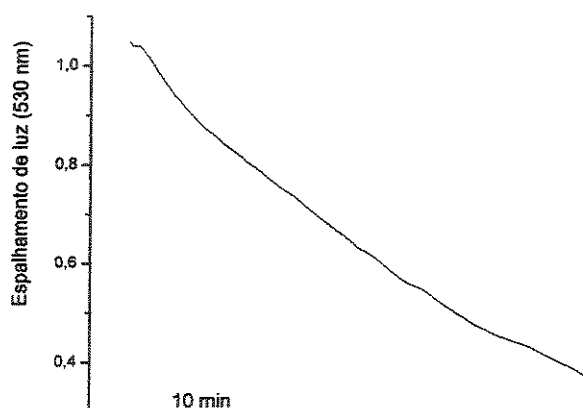


Figura 9- Monitoramento da permeabilização de células de *Candida parapsilosis* ATCC22019 usando liticase

A caracterização bioenergética da CpUCP foi realizada com esferoplastos de *Candida parapsilosis*. A figura 10 demonstra que as mitocôndrias *in situ* apresentaram o comportamento típico da presença da UCP, pois uma queda parcial do potencial foi induzida por ácido graxo, sendo este efeito eliminado pela adição de BSA no meio de reação.

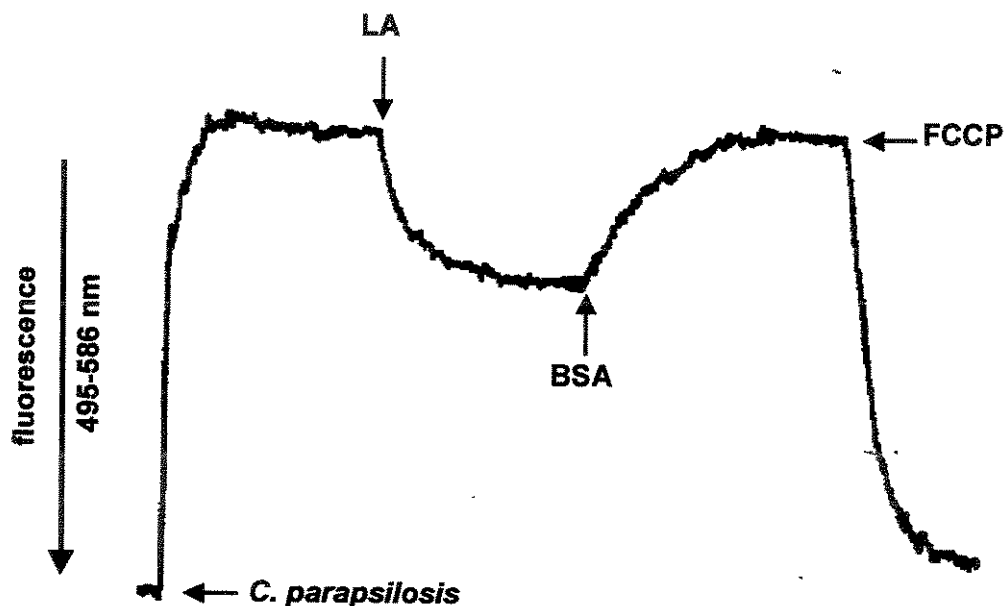


Figura 10- Diminuição do potencial mitocondrial de esferoplastos de *C. parapsilosis* induzida por 4 μ M ácido linoleico (LA) e recuperada por 0,5% BSA na presença de 1 μ M carboxyatractylosideo (CAT). Esferoplastos de *C. parapsilosis* (1 mg/ml) foram adicionados em um meio de reação padrão contendo 5 mM succinato e 5 μ M safranina O.

A proteína total foi extraída de mitocôndrias isoladas de *C. parapsilosis* e a imunodeteção feita com anticorpos contra PUMP de *Arabidopsis* (AtPUMP) ou de batata (StPUMP) identificou 1 banda de 32 KDa (figura 11) que foi atribuída à proteína desacopladora de *Candida parapsilosis*.

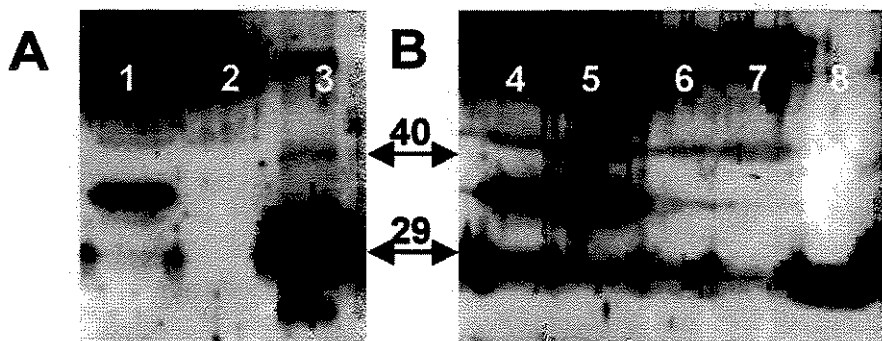


Figura 11a- Imunoblots de CpUCP em mitocôndrias de *Candida parapsilosis*. Detecção da proteína desacopladora pelo anti-AtPUMP (A) ou anti-StPUMP (B) em proteína total extraída de mitocôndrias preparadas das células frescas faixas (1, 4 e 5) ou guardadas em água por 2 dias faixas (2, 6 e 7). Faixas 3 e 8 representam controle positivo – AtPUMP recombinante. Setas demonstram a posição do marcador com peso molecular em kDa.

A proteína total também foi extraída a partir de esferoplastos de *C. parapsilosis* (figura 11.b).

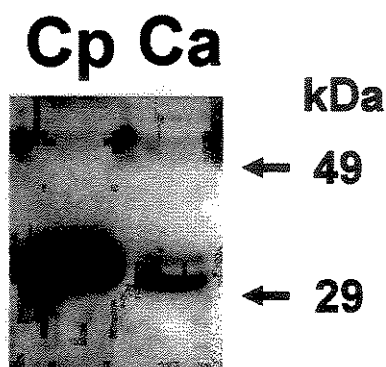


Figura 11b- Imunoblot de CpUCP em esferoplastos de *Candida parapsilosis*. Detecção da proteína desacopladora pelo anti-AtPUMP em proteína total extraída de esferoplastos preparadas das células de *Candida parapsilosis* (faixa Cp) e de *Candida albicans* (faixa Ca)

Setas demonstram a posição do marcador com peso molecular em kDa.

A curva representada na figura 12 avalia a CpUCP em relação ao crescimento da cultura a cada 4 horas do crescimento de *C. parapsilosis*.

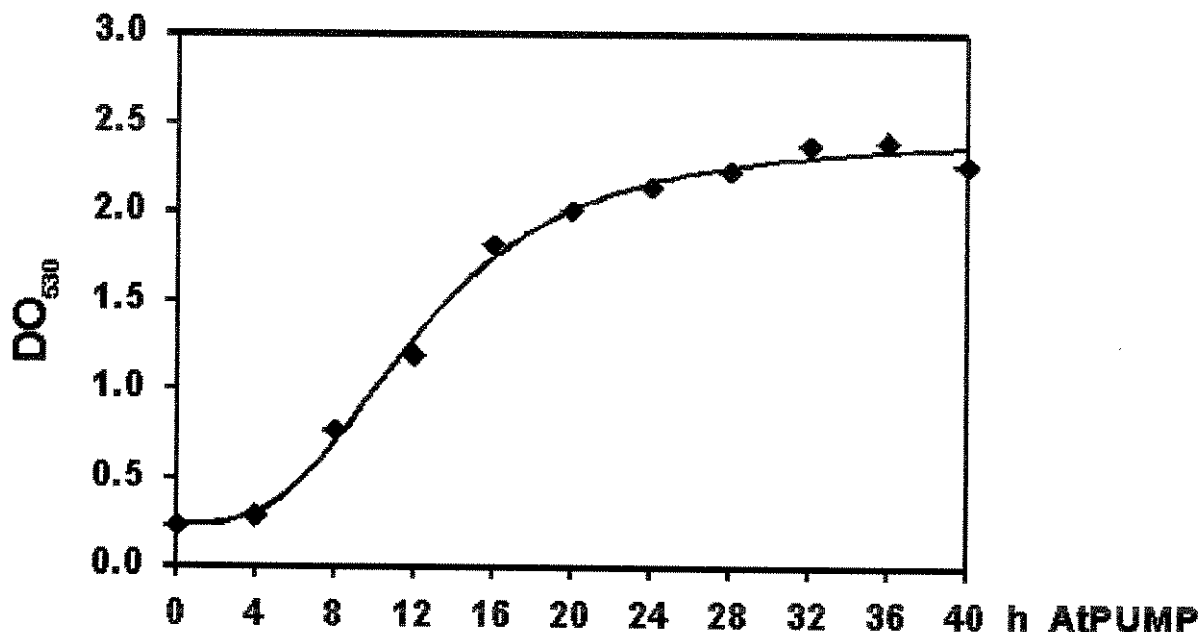


Figura 12- Perfil de expressão da CpUCP durante o crescimento da cultura e o acúmulo do produto protéico visualizado imuniquimicamente. O imunoblot mostrou indução da expressão de dois genes, o primeiro iniciando após 16 horas e o segundo após 36 horas de crescimento da cultura. A detecção foi feita com o anticorpo anti-AtPUMP1 policlonal. A banda indicada com AtPUMP representa controle positivo.

Após extração das proteínas às 12, 16 e 36 horas de crescimento com as drogas: Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Anfotericina B foram realizadas as leituras da densidade óptica, que pode ser observada nas figuras 13, 14, 15 e 16. Os dados brutos podem ser observados no anexo 2.

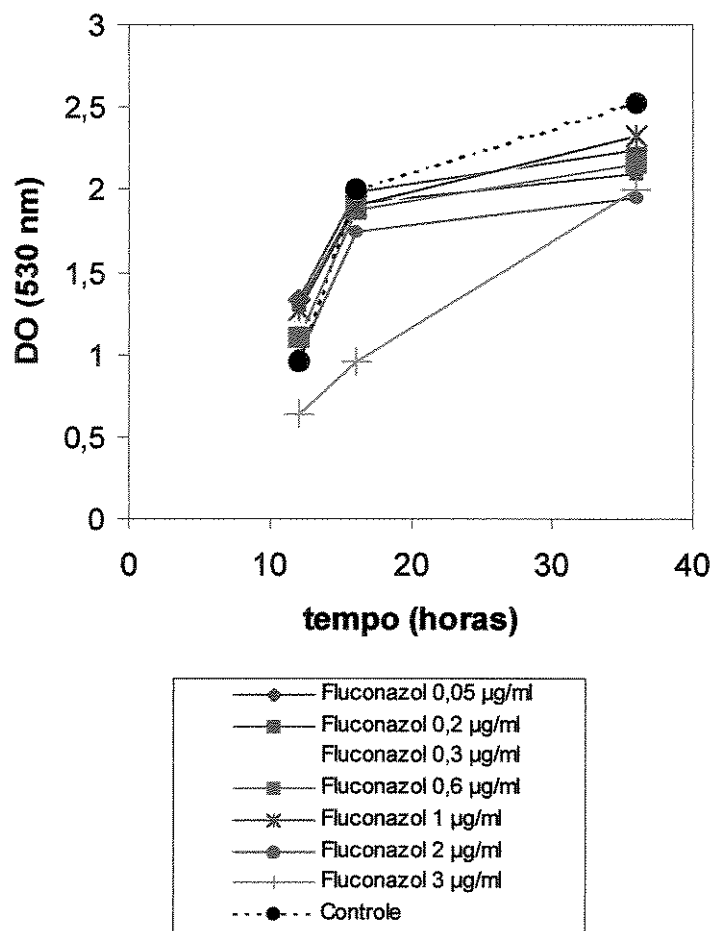


Figura 13a- Expressão da CpUCP no crescimento da cultura em meio YEPG, na presença de concentrações de 0,05 a 3,0 µg/ml fluconazol.

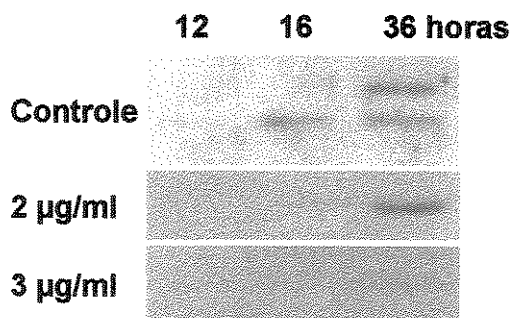


Figura 13b- Imunodeteção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 horas de crescimento da cultura, na ausência (controle) e presença de 2 e 3 µg/ml de fluconazol.

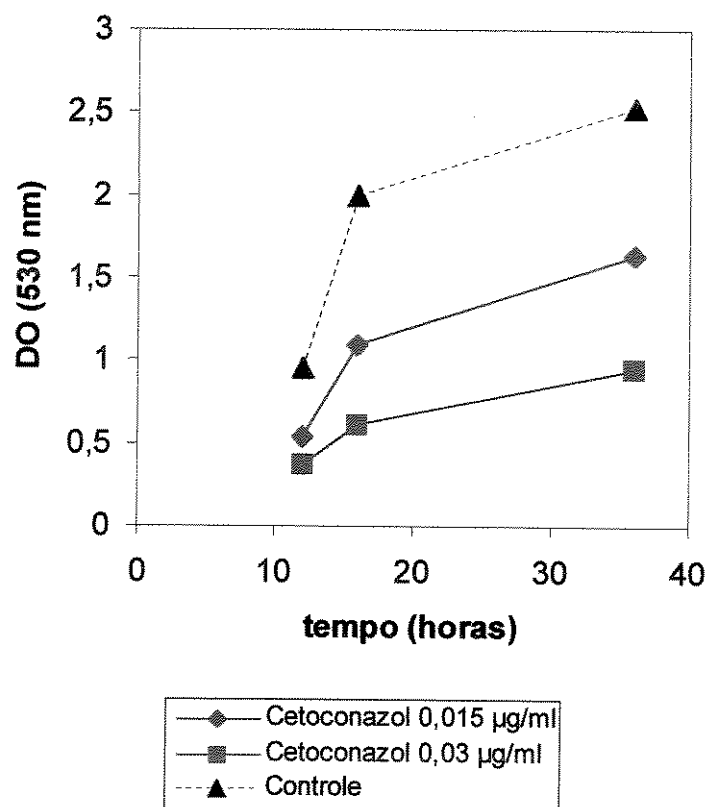


Figura 14a- Expressão da CpUCP no crescimento da cultura em meio YEPG, na presença de 0,015 e 0,03 µg/ml de cetoconazol.

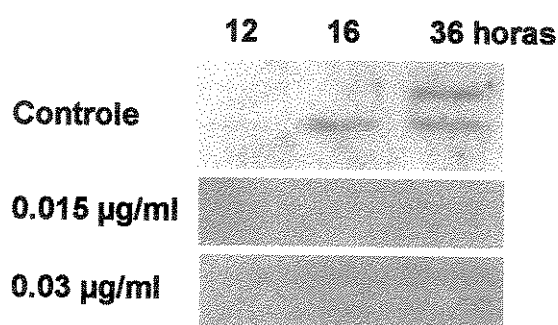


Figura 14b- Imunodeteccção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 horas de crescimento da cultura, na ausência (controle) e presença de 0,015 e 0,03 µg/ml de cetoconazol.

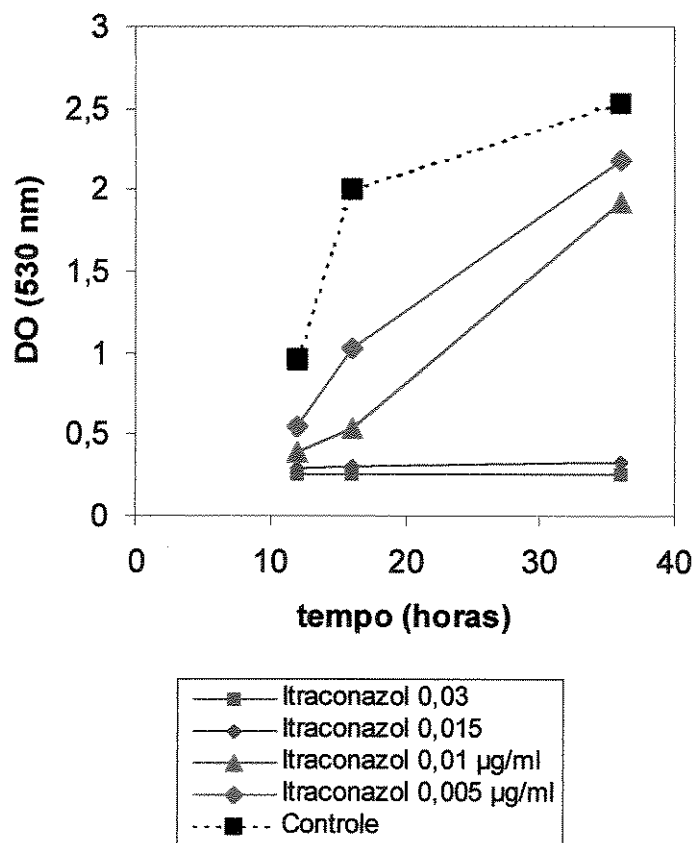


Figura 15a- Expressão da CpUCP no crescimento da cultura em meio YEPG, na presença de concentrações de 0,03 a 0,005 µg/ml de itraconazol.

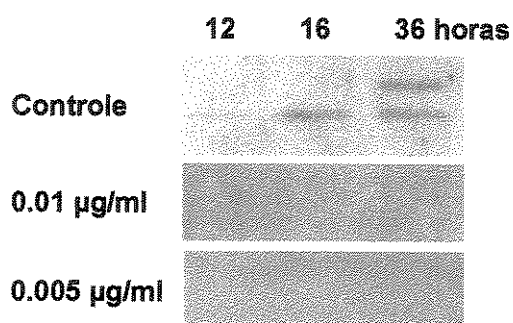


Figura 15b- Imunodeteccção do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 horas de crescimento da cultura, na ausência (controle) e presença de 0,01 e 0,005 µg/ml de itraconazol.

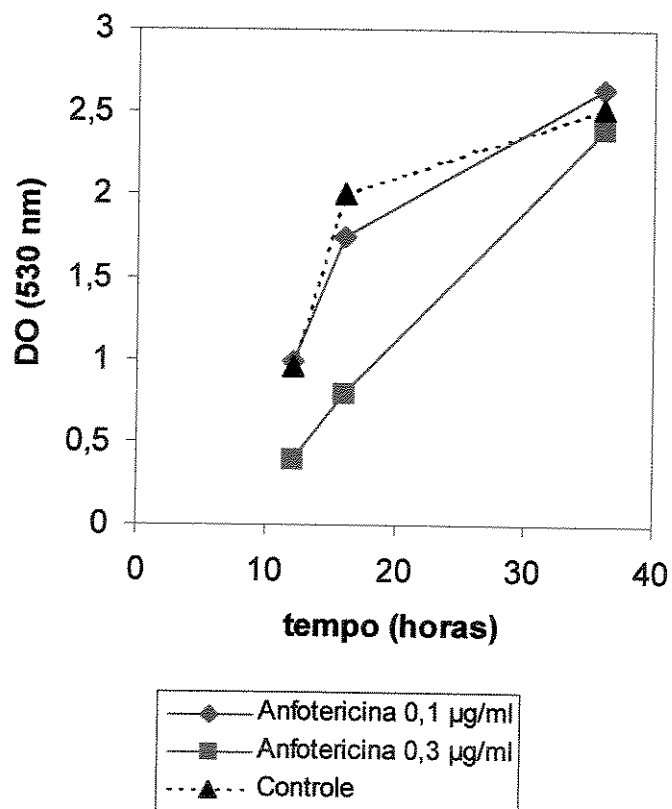


Figura 16a- Expressão da CpUCP no crescimento da cultura em meio YEPG, na presença de 0,1 e 0,3 µg/ml de anfotericina.

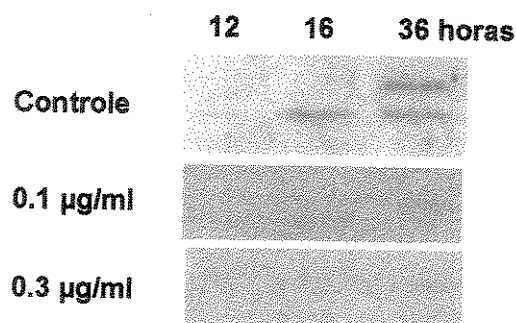


Figura 16b- Imunodeteccão do acúmulo de CpUCP às 12, 16 e 36 horas de crescimento da cultura, na ausência (controle) e presença de 0,1 e 0,3 µg/ml de anfotericina.

Busca das seqüências homólogas em database

Foram comparadas as seqüências protéicas de UCP 1, 2, 3, 4, e 5 e AtPUMP1 e 2 e ZmPUMP e OsPUMP1 e 2 com os databases não redundantes e EST em GeneBank no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e também o sequenciamento de *Candida parapsilosis* no site de Stanford Genome Technology Center (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) utilizando o método de tblastn (proteína versus nucleotídeos traduzidos em 6 fases de leitura). O resultado é ilustrado na Figura 17. Até agora não foi encontrada nenhuma proteína desacopladora dentro do grupo dos fungos, mas foi identificado um transportador de ADP/ATP de *C. parapsilosis* (Accession AF085429) e um provável trocador de 2-oxoglutarato/malato (Contig 6-2365). As duas seqüências foram utilizadas em desenhos de primers para excluir uma clonagem do gene que não codifica CpUCP.

UCP1_MOUSE NAYRIATTEESSTLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP1_MESAU NAYRIATTEESSTLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP1_RABIT NAYRIATTEESSTLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP1_BOVIN NAYRIATTEESSTLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP1_HUMAN NAYRIATTEESSTLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP2_MOUSE BAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP2_HUMAN BAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP2_PIG DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP2_DANIO DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP2_Cypri DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP3_PIG DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP3_HUMAN DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP3_BOVIN DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP3_MOUSE DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SsPUMP1 -----YDCLGPNARNALINAAELASVDQF-QMPLNGLFTDN-VTHLGLAGAG-FAVCIGSPVDVVKSRMMDGDS-----TYRSTL-----DCAFKTLND
SsPUMP2 DAYSKIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
ATPUMP1 NAYSTIVRQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
ATPUMP2 DAYRTIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP4a_RAT HAFAKILABEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP4_HUMAN HAFAKILABEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SimM1C_c.e DCFRSIYATRQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
AtPUMP3 EAFTKILQSGEGVGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SsPUMP3 ER-----GLQF-----VHGHFVMAKILTCGKIQKRFIREQIWDNN-LYATILASMGSGLEFCTTLLSCPADVIKTRMMNQKGE-----GKAMVRSY-----DCLVKTVAH
BMCP_MOUSE GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP51_MOUSE GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP55_RAT GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP55_RAT GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
UCP51_HUMAN GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
BMCP_HUMAN GSFDIYQOEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
M20M_c.ele DCLVRIITRQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
DiCa_Mouse DCLVRIITRQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
CaContig6-2365 DCLVRIITRQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
M20M_HUMAN NALIRITAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
M20M_RAT NALIRITAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
M20M_BOVIN NALIRITAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
M20M_P.mil HALYRIADQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SsM20M HALYRIADQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
AtM20M HALYRIADQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SsPUMP5 DAIGRWARDEGVSLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
SsPUMP6 DAIGRWARDEGVSLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
ATPUMP5 DAIRSVHVGEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
ATPUMP4 DAITQHIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
ATPUMP6 DAIDRIAREEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
MTP_YEAST NGLVITIFKTEGVSLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
T18253 GVAAHYITAGGLSLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
AAC34595 DVYKKTLASQEGFGLWKGTTNPLNRNVIINCTELVTYDLMKGALVNNKILADD-VPCHLLSALVAGFCTTLLASPDVVVKTRFINSPLG-----QYSPVP-----SCAMMYTKK
consensus 241.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....

UCP1_MOUSE GPTAFFKGFVPSFLRLGSNNVIMFVTEQLKELMKSRQTVDCCT
UCP1_MESAU GPTAFFKGFVPSFLRLGSNNVIMFVTEQLKELMKSRQTVDCCT
UCP1_RABIT GPTAFFKGFVPSFLRLGSNNVIMFVTEQLKELMKSRQTVDCCT
UCP1_BOVIN GPTAFFKGFVPSFLRLGSNNVIMFVTEQLKELMKSRQTVDCCT
UCP1_HUMAN GPTAFFKGFVPSFLRLGSNNVIMFVTEQLKELMKSRQTVDCCT
UCP2_MOUSE GPRAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMAAQSREAPF
UCP2_HUMAN GPRAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMAAQSREAPF
UCP2_PIG GPRAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMAAQSREAPF
UCP2_DANIO GPKAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMAAQSREAPF
UCP2_Cypri GPKAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMAAQSREAPF
UCP3_PIG GPTAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP3_HUMAN GPTAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP3_BOVIN GPTAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP3_MOUSE GPTAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsPUMP1 GPGAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsPUMP2 GPLAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
ATPUMP1 GPMAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
ATPUMP2 GIMAFYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP4a_RAT GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP4_HUMAN GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SimM1C_c.e GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
AtPUMP3 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsPUMP3 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
BMCP_MOUSE GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP51_MOUSE GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP55_RAT GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP55_RAT GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
UCP51_HUMAN GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
BMCP_HUMAN GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
M20M_c.ele GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
DiCa_Mouse GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
CaContig6-2365 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
M20M_HUMAN GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
M20M_RAT GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
M20M_BOVIN GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
M20M_P.mil GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsM20M GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
AtM20M GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsPUMP5 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
SsPUMP6 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
ATPUMP5 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
ATPUMP4 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
ATPUMP6 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
MTP_YEAST GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
T18253 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
AAC34595 GFLSLYKGFMPSPFLRLGSNNVIMFVTEQLKRALMKVQMLRESFP
consensus 361.....370.....380.....390.....400.....

Figura 17- Alinhamento das seqüências das proteínas desacopladoras de animais e plantas e transportadoras de malato/2-oxoglutarato depositadas no GeneBank com as seqüências proteicas de desaduzas de clones de UCPs/PUMPs (CaContig6-2365 e AAC34595). Agrupamento no alinhamento múltiplo mostra que CaContig6-2365 codifica antes o trocador do que UCP de fungo e AAC34595 é provavelmente gene codificante do trocador ADP/ATP. Letras em vermelho simbolizam aminoácidos conservados e letras em azul os aminoácidos semelhantes.

Tentativa de isolar o gene da CpUCP

Para a tentativa de identificação do gene que codifica CpUCP foi realizado o desenho dos primers degenerados. Sequências protéicas dos 28 representantes das UCPs/PUMP conhecidas foram selecionadas e alinhadas utilizando programa CLUSTALW. No alinhamento foram incluídas outras seqüências dos 7 representantes de M2OMs (trocador mitocondrial de malato/2-oxoglutarato) como um membro da superfamília dos trocadores aniônicos mitocondriais (MACF) mais próximo das UCPs/PUMPs. Após alinhamento de todas as seqüências protéicas, elas foram substituídas por seqüências gênicas correspondentes, mantendo a posição do alinhamento das proteínas. Os primers por volta de 24 pares de bases, foram escolhidos dentro das regiões mais conservadas (Figura 18), sendo 2 próximos do início forward e 2 próximos do final reverso da seqüência aberta de leitura ("open reading frame", ORF). Todas as 4 seqüências foram conferidas para serem diferentes de regiões correspondentes em *M2OMs*.

Início do ORF

[illegible]

Final do ORF

[illegible]

Figura 18- Alinhamento das proteínas de 28 UCPs/PUMPs e 7 M2OMs com os genes correspondentes incluídos. Primers (2 "forward" e 2 reversos, acima dos alinhamentos) foram escolhidos em regiões conservadas e específicas dos UCPs/PUMPs

Para obter o material inicial do gene, foi extraído o RNA total da *Candida parapsilosis* (item 3.10). Este RNA foi utilizado como template para RT-PCR e também como material inicial para construção de uma biblioteca cDNA.

A qualidade do RNA foi monitorada pela eletroforese em um gel de 1% de agarose (item 3.10.1, Figura 20).



Figura 19- Eletroforese em gel de 1% de agarose de duas frações do RNA total de *Candida parapsilosis*.

O RNA total (5 µg) foi utilizado em condições iniciais para isolar o gene da CpUCP. A PCR seguinte feita com quantidades padrão (2 µl de cDNA sintetizado por RT e 2.5 pmol de cada primer) e temperatura de anelamento média dos primers degenerados (65 °C) não resultou em uma quantidade detectável do produto. Para obter quantidades suficientes, foram feitos vários reajustes das condições tanto da síntese da primeira fita do cDNA como da PCR. Primeiro, a temperatura do anelamento foi diminuída até a temperatura mínima dos primers degenerados (56 °C), sem alcançar o produto. Conseqüentemente foi aumentada a quantidade do RNA total inicial para 25 e 50 µg e a PCR testada com temperaturas de anelamento de 65-55 °C. Finalmente, a concentração de primers foi elevada até 50 pmol (20x) por causa das suas múltiplas degenerações. Entretanto, as condições ótimas para amplificar o gene da CpUCP não foram encontradas. No passo seguinte, foi empregada estratégia ampliada. A PCR foi testada com temperaturas decrescentes, porém sem detectar bandas de prováveis produtos. O terceiro passo foi desenhar outro conjunto dos primers, mais curtos e com um número de degenerações minimizado, elevando assim a concentração relativa do primer com seqüência correta. Para desenhar os primers, foi considerada a parte do gene mais conservada – seqüências

correspondentes às assinaturas das proteínas de transferência de energia (“Energy Transfer Proteins Signature” – ETPS), resultando em dois primers “forward” (1signA-F 5'CCATTGGATrTTGTAAACTAr 3' e 1signB-F 5'CCAATTGATACTrTTAAAw-CTAG 3') e três primers reversos (3signC-R 5'CTAGTTTTTAACAAYATCYAATGG 3', 3signD-R -5'CTAGTTTTTCATAACATCAGCTGG 3' e 3signE-R 5'CTAGTTTTTAAC-AACATCAATTGG 3'). PCR foi feito com cDNA sintetizado e várias combinações dos primers “forward” e reversos foram testadas. PCR com as combinações 1signA-F/3signE-R e 1signB-F/3signC-R resultou em detecção de bandas do produto de tamanho esperado (~700 pb). Porém, após a clonagem dos produtos purificados dos produtos em vetor pGEM-T EASY, o seqüenciamento mostrou seqüências com baixa similaridade com os *UCPs/PUMPs* já conhecidos. Recentemente, novos produtos de PCR com variações em concentrações de cDNA (2-10 µl da RT), primers (3-5 pmol), cloreto de magnésio (1,5-3,0 mM) e temperaturas de anelamento (44 °C a 52 °C) estão sendo preparados para serem seqüenciados.

Detecção do gene da CpUCP em biblioteca dos ESTs da *C. parapsilosis*

Utilizando a estratégia descrita por Ito (1999) e empregando um kit para isolar RNA mensageiro Oligotex (QiaGene) e um kit para construção de bibliotecas “SuperScript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen), uma biblioteca de cDNA de *C. parapsilosis* está sendo construída, seqüenciada em 3700 DNA Analyzer (Applied BioSystems) e analisada, empregando-se sondas específicas, de maneira a viabilizar a obtenção de novos clones.

Estudo do perfil de expressão do gene da CpUCP

A extração do RNA foi realizada a cada 4 horas até 40 horas do crescimento da *C. parapsilosis* em meio YEPG. A figura 20, representa as amostras do RNA isolado das células de *C. parapsilosis* durante o crescimento da cultura a fim de poder detectar

mudanças na expressão do gene que codifica CpUCP uma vez que será possível isolar o gene e utilizá-lo como uma sonda no RNA-blot.

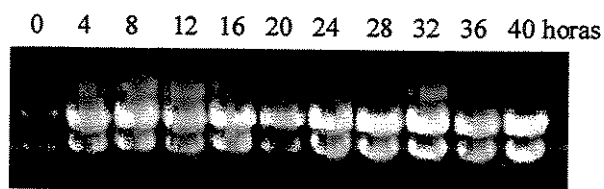


Figura 20- Eletroforese do RNA total extraído das células de *Candida parapsilosis* coletadas durante crescimento de cultura em gel de 1% de agarose.

5- DISCUSSÃO

No projeto inicial, o objetivo principal era na realidade a identificação e clonagem do gene que codifica proteína desacopladora de *Candida parapsilosis*. No entanto, devido às inúmeras dificuldades encontradas, concomitantemente aos procedimentos do protocolo de clonagem, foram surgindo outras questões que passaram a ser investigadas em paralelo. Assim, inicialmente foi realizado um levantamento retrospectivo com o intuito de avaliar a prevalência de isolamentos de cepas de *C. parapsilosis* em nossa instituição.

Foram avaliados os arquivos do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas-UNICAMP nos anos de 1998 a 2003, considerando todas as cepas de *Candida parapsilosis* isoladas a partir de diferentes espécimes clínicos coletados de pacientes atendidos por diversos serviços (figura 6).

Em um total de 2803 tipos de cepas *Candida* isoladas de vários espécimes clínicos coletados de pacientes, *C. parapsilosis* representou 6 % das etiologias diagnosticadas (Figura 4).

Embora a relação número de cepas/pacientes seja variável e de acordo com o número de exames solicitados, foi possível observar um aumento anual do número de pacientes colonizados/infectados por *C. parapsilosis* (figura 5).

Quanto à avaliação das diferentes clínicas, as maiores porcentagens de isolamento foram observadas respectivamente nas enfermarias de pediatria (18%), neonatologia (10,5%) e hematologia/transplante de medula (9,5%) (figura 6).

Foi observada uma maior quantidade de isolados de *C. parapsilosis* a partir de amostras de sangue (29%), sendo deste o maior número proveniente da pediatria (20%), hematologia/transplante de medula (14,5%) e cirurgia do trauma (13,5%), (figura 7 e tabela 1). Em seguida, os isolados a partir de urina (12%) foram mais freqüentes na neonatologia (24,5%) e os de ponta de cateter mais representativo na gastro/cirurgia (15%), moléstias infecciosas (15%) e pediatria (11,5%) (figura 7 e tabela 1). O grande número de isolados de pele (50%), foi resultante da investigação de surto de infecção na neonatologia (tabela 1).

Acompanhando os avanços da tecnologia, vários estudos têm demonstrado um aumento nas fungemias nosocomiais. Nossos resultados foram similares a outros estudos em que espécies de *Candida* foram a maior causa destas fungemias diagnosticadas (GODOY et al, 2003).

Estas fungemias tem sido associadas a um grande número de doenças de base (HARVERY et al., 1987), e vários fatores de risco como neutropenia, cateter venoso central, cirurgia abdominal e antibiótico de amplo espectro (WRIGHT et al., 1997). Infecções causadas por *C. parapsilosis* também tem sido associadas a sua capacidade de produção de slime (PFALLER et al., 1995).

COLOMBO et al. (1999), relataram que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, foram as duas espécies de *Candida não albicans* mais comumente isoladas dentre 145 episódios de candidemia documentada durante 18 meses de estudo incluindo 6 diferentes hospitais no Brasil. COSTA et al. (2000), depois de avaliar 86 casos consecutivos de candidemias documentadas em um hospital de São Paulo, observaram que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram responsáveis pela maioria das espécies não *C. albicans* diagnosticadas. PFALLER et al. (2001), relataram que em hospitais da América Latina que participam do SENTRY, *C. parapsilosis* foi a segunda espécie de *Candida* mais freqüentemente responsável pelas infecções na corrente sanguínea.

Uma vez observada a importância clínica e prevalência das cepas de *C. parapsilosis* entre os pacientes do HC-Unicamp, tornou-se necessário um conhecimento mais detalhado de características bioquímicas destes microrganismos, com vistas à elucidação de seus mecanismos de tolerância às drogas e/ou a descoberta de novos alvos para alternativas terapêuticas.

Para os estudos bioquímicos, os microrganismos devem ser multiplicados em um meio que favoreça o crescimento rápido sem alteração de características fenotípicas essenciais.

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 provenientes de 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 o tempo necessário para obtenção das células nesta fase.

A curva de crescimento para a espécie *Candida parapsilosis* ATCC 22019, no meio de cultura YEPG, que está representada na figura 8, pode ser acompanhada até a fase estacionária (3 leituras de DO muito próximas). A fase de declínio não pôde ser evidenciada através da metodologia de cultura em meio líquido, pois, apesar da morte das células, estas permaneceram no meio de cultura e, conseqüentemente, as leituras de densidade óptica mantiveram-se constantes.

Nestas condições, determinou-se o início da fase exponencial e o tempo de crescimento máximo para a espécie de *C. parapsilosis* ATCC 22019, respectivamente em 8:54 h e após 18:31 h de incubação.

Estudos bioquímicos são realizados com células permeabilizadas/sem parede celular (esferoplastos). 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. No nosso trabalho, células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (figura 9), obtidas em YEPG, necessitaram de 60 minutos de contato com a enzima para que 90% das células fossem convertidas em esferoplastos.

Recentemente, foi identificada no Reino Fungi, uma proteína desacopladora, um sistema dissipador de energia que pode também modular o $\Delta\Psi$ e a velocidade respiratória, denominada UCP da *C. parapsilosis* (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000), ainda não detectada em *Saccharomyces cerevisiae* (ELMOUALIJ et al., 1997).

A caracterização da bioenergética mitocondrial da *C. parapsilosis* foi realizada seguindo a metodologia de MILANI et al. (2001). As leveduras foram crescidas em meio de cultura líquido, YEPG, até a metade da fase exponencial de sua curva de crescimento (Figura 10).

As proteínas desacopladoras são geralmente ativadas por FFAs e inibidas por ATP (ŽÁČKOVÁ et al., 2002; JABŮREK et al., 1999; JEZEK et al., 1998).

Na figura 11a, a existência de uma proteína desacopladora (UCP), homóloga a AtPUMP foi detectada em mitocôndrias de *C. parapsilosis* ATCC 22019, através de análises de “imunoblot” utilizando anticorpos anti-AtPUMP1 (HANÁK et al., 2001). A tentativa de manter as células em água para permitir a continuação e repetição de experimentos em dias subsequentes, com as mesmas células, mostrou-se viável para vários parâmetros (dados não publicados). No entanto, neste processo, a proteína desacopladora parece sofrer degradação.

Na figura 11b, o mesmo experimento foi realizado em esferoplastos de *C. parapsilosis* com resultados semelhantes.

A presença de uma proteína desacopladora em espécies de *Candida* pode significar um 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).

Analizando a expressão de CpUCP no decorrer da curva de crescimento de *C. parapsilosis* em meio YEPG (figura 12), foi possível observar que sua expressão tem início coincidente com a fase de aceleração da fase exponencial e que, a partir de 36 h (fase estacionária), duas bandas puderam ser identificadas.

Estes resultados sugerem que a CpUCP pode estar relacionada a situações de estresse devido ao acúmulo de células de *Candida parapsilosis* detectável depois do crescimento máximo, que acarreta redução de oferta de nutrientes, oxigênio e produção de metabólitos tóxicos.

Com o intuito de avaliar algum possível envolvimento dos antifúngicos com outros mecanismos metabólicos destas leveduras, além dos já conhecidos, estudou-se o efeito de diferentes concentrações destas drogas no potencial de membrana. Nenhuma alteração foi observada. No entanto, a realização de novas curvas de crescimento de *C. parapsilosis* em meio YEPG, na presença de concentrações subinibitórias dos

antifúngicos, fluconazol 2 µg/ml e 3 µg/ml, cetoconazol 0,015 µg/ml e 0,03 µg/ml, itraconazol 0,01 µg/ml e 0,005 µg/ml anfotericina 0,1 µg/ml e 0,3 µg/ml, demonstrou por tempo de forma proporcional ao aumento da concentração da droga (figuras, 13a, 14a, 15a, 16a).

Do mesmo modo, estas concentrações de antifúngicos parecem influir na expressão da proteína desacopladora (figuras 13b, 14b, 15b, 16b). Na realidade, estes resultados sugerem que algum tipo de expressão do gene pode ocorrer, devido ao baixo acúmulo de CpUCP durante o crescimento da célula na presença de drogas. Isto pode ter uma grande influência na bioenergética mitocondrial desta levedura, na qual a proteína desacopladora é considerada um regulador de super produção de espécies reativas de oxigênio (BORECKÝ et al., 2001, SKULACHEV, 1998).

Foram realizadas tentativas de caracterização bioenergética da CpUCP em células pós tratamento com as diferentes concentrações de drogas. No entanto, os experimentos não foram satisfatórios. Não havia queda de potencial após adição de FCCP, os demais traçados eram irregulares e até mesmo as características microscópicas do sedimento de esferoplastos se mostrou alterada.

A presença em *C. albicans* de uma cadeia alternativa de transferência de elétrons (HELMERHORST 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.

Para poder determinar com mais exatidão a real função da CpUCP, seria ideal, conhecer o gene que a codifica, cloná-lo e após obter a sua expressão, seguir estudos mais detalhados. Deste modo, foi dado início aos procedimentos voltados ao objetivo de identificar e clonar o gene que codifica a CpUCP e que estão detalhados nos itens de 3.10 a 3.10.2.

O primeiro objetivo foi buscar nos bancos de dados um EST que exibisse alta homologia com os genes de UCP já conhecidos. Este EST foi usado como uma sonda para identificar o gene em biblioteca de cDNA da *Candida parapsilosis*. Clones positivos foram subclonados para plasmídeo pBLUESCRIPT SK- e seqüências com os maiores insertos seqüenciadas em seqüenciador automático ABI 310. Como não foi possível achar um EST, seguiu-se a estratégia descrita por WATANABE e HIRAI (2001). Foram desenhados os primers degenerados que correspondem às regiões da UCP mais conservadas (primeira e terceira, assinatura). Produtos de RT PCR com os primers e RNA total de *Candida parapsilosis* foram clonados em plasmídeo pGEM-T EASY e seqüenciados. Clones cujas seqüências tiveram alta homologia com as UCPs conhecidas serviram: 1) como uma sonda específica e 2) para desenhar primers de gene específico para amplificar as demais regiões desse gene. Utilizou-se PCR com RNA total e primer oligo-dTv20 para região 3' final ou primer degenerado baseado na região conservada em N-terminal das UCPs conhecidas para região 5' final. Após o seqüenciamento de todas as regiões, pôde-se determinar o gene completo na base de alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida de cDNA com as UCPs conhecidas, e o gene inteiro ser amplificado por RT PCR com primers específicos desenhados fora da região codante.

Para confirmar a identidade da proteína desacopladora de fungo, seria necessário o alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzidos com proteínas da superfamília de transportadores aniônicos mitocondriais para construir uma árvore filogenética. A presença da seqüência identificada no ramo das UCPs conhecidas confirmaria se é a verdadeira CpUCP. Em seguida, foi feita uma previsão de seqüências conservadas através do conjunto de programas MEME-MAST (<http://www.sdsc.edu/MEME>). A CpUCP também foi examinada pela presença das 3 variações de assinatura característica ("Energy Transfer Proteins Signature") específica para todas as UCPs/PUMPs (BORECKÝ et al., 2000).

A extração de RNA também foi realizada após intervalos de 4 horas de crescimento, no intuito de detectar possíveis alterações na expressão do gene que codifica CpUCP. Entretanto como mostra a figura 20, não foi possível determinar tais alterações.

Na realidade, este trabalho, pode ser considerado um piloto, para futuras outras frentes de trabalho, sob diversos aspectos do metabolismo da *C. parapsilosis* ATCC 22019, assim como de outros patógenos fúngicos emergentes.

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

Conclusões e perspectivas futuras

Avaliando os dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A incidência e o isolamento de cepas de *C. parapsilosis* são bastante relevantes em nossa instituição e vêm crescendo no decorrer dos anos. Deste modo, é extremamente proveitosa a caracterização bioenergética e a análise de expressão de CpUCP, a partir de cepas recentemente isoladas de espécimes clínicos.
2. Foi possível determinar que a CpUCP tem expressão diferenciada, na dependência da fase da curva de crescimento da cultura de *C. parapsilosis*.
3. Pela diminuição do acúmulo da CpUCP a expressão do gene da CpUCP parece ser progressivamente inibida por concentrações crescentes de antifúngicos, evidenciando talvez, mais um aspecto envolvido em seu mecanismo de ação.
4. A caracterização do papel fisiológico da CpUCP no metabolismo da *C. parapsilosis* e na sua resposta à administração dos antifúngicos poderia evidenciar um novo alvo para novas drogas terapêuticas, ou mais um processo envolvido nos efeitos colaterais dos antifúngicos em uso.
5. As questões ainda em aberto, em relação às características e real papel fisiológico da CpUCP, provavelmente só serão respondidos após a identificação e clonagem do gene que a codifica. Assim sendo, os procedimentos de busca do gene deverão ser retomados, a partir do RNA total já extraído e que se encontra devidamente armazenado.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JASSER, A.M.; ELKHIZZI, N.A. Distribution of *Candida* species among bloodstream isolates. **Saudi Med J**, **25(5)**: 566-9, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** **25**:3389-3402, 1997.
- BARBOSA, H.R. Crescimento. In: BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Microbiologia Básica. Rio de Janeiro: **Editora Ateneu**, 1999.p.103-109.
- BRANCHINI, M.L.; PFALLER, M.A.; CHALBERG, J.R.; FREMPONG, T.; ISEMBERG, H.D. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, **32(2)**: 452-56, 1994.
- BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; COSTA, A.D.T.; JEZEK, P.; CHAIMOVICH, H.; de ANDRADE, P.B.M.; VERCESI, A.E. e ARRUDA, P. Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, **505**:240-244, 2001.
- 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.G. The alternative respiration pathway of the yeast *Candida parapsilosis*: Oxidation of exogenous NAD(P)H. **J Gen Microbiol.**, **134**:3195-3204, 1988.
- CAMOUGRAND, N.; MILA, B.; VELOURS, G.; LAZOWSKA, J. & GUERIN, M. Discrimination between different groups of *Candida parapsilosis* by mitochondrial DNA restriction analysis. **Curr Genet.**, **13**:445-449, 1988.

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

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.

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.

COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINNI, M.L.; KUSSANO, E.J.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol**, 41(3): 235-239, 2003

COSTA, S. F.; MARINHO, I.; ARAUJO, E. A. P.; MANRIQUE, A. E. I.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVIN, A.S. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. **Journal of Hospital Infection** 45:69-72, 2000.

CHRISTINE, C; TERREL, C.L. Antifungal agents: PartII – The azoles. **Mayo Clin Proc** 74:78-100, 1999.

DARWAZAH, A. *Candida parapsilosis*: an unusual organism causing prosthetic heart valve infective endocarditis. **J Infect.**, 38(2): 130-1, 1999.

DOUCE, R.; NEUBURGER, M. Biochemistry and function of the plastid envelope. **Annu. Ver. Plant Physiol.Plant Mol. Biol.**, 40:371-414, 1989.

DURAN, M.T.; VELASCO, D.; CANICHE, D.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. Isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **21**(9): 488-492, 2003.

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.

GHANNOUM, M.A.; RICE, B.L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance. *Clin Microbiol Rev*, **12**(4): 501- 517, 1999.

GODOY, P., TIRABOSCHI, I.N., SEVERO, L.C., BUSTAMANTE,B.,CALVA,B., ALMEIDA,L.P., MATTA,D.A., COLOMBO,A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98**(3), 2003.

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.

GREENBERG, C. S.; CRADDOCK, P. R. Rapid single-step membrane protein assay. **Clin Chem** 28:1725-1726, 1982.

GUÉRIN, M.; CAMOUGRAND, N. The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. **Eur J Biochem**, 159:519-524, 1986.

GUERIN, M.; CAMOUGRAND, N.; CAUBET, R.; ZNIBER, S.; VELOURS, G.; MANON, S.; GUELIN, E. & CHEYROU, A. The second respiratory chain of *Candida 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.

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.

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.
- HUANG, Y.C.; LIN, T.Y.; PENG, H.L.; WU, J.H.; CHANG, H.Y.; LEU, H.S. Outbreak of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis.*, **30**(2): 137-42, 1998.
- ITO, K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Sci.*, **149**:167-173, 1999.
- JABŮREK, M.; VARECHA, M.; GEMEMO, R.E.; DEMOSKI, 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* mitochondria1. *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.; 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.

JEZEK, P.; ENGSTOVÁ, H.; ŽÁCKOVÁ, M.; VERCESI, A.E.; COSTA, A.D.T; ARRUDA, P.; GARLID, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim Biophys Acta Rev**, **1365**(1-2): 319-27, 1998.

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. **Cancer**, **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 dimmer can form a disulfite cross-link between the mobile C-terminal SH groups. **FEBS Lett**, **180**:123-131, 1989.

KLINGSPOR, L.; TORNQVIST, E.; JOHANSSON, A.; PETRINI, B.; FORSUM, U.; HEDIN, G. A prospective epidemiological survey of candidaemia in Sweden. **Scand J Infect Dis**, 36(1): 52-5, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, D.S.; DOWELL, V.R. J.R., SOMMERS, H.M.. Micologia. In: KONEMAN, 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.

LALOI, M.; KLEIN, M.; REISMEIER, J.W.; MÜLLER-RÖBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F. e RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, 389: 135-136, 1997.

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.405-424.

LEITHOLD, L. **O cálculo com geometria Analítica**. 2ªed, São Paulo: Harper & Row, 1982. p.344-351. v.I

LEVIN, A.S.; COSTA, S.F.; MUSSI, N.S.; BASSO, M.; SINTO, S.I.; MACHADO, C.; GEIGER, D.C.; VILLARES, M.C.; SCHREIBER, A.Z.; BARONE, A.A.; BRANCHINI, M.L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 30(4): 243-249, 1998.

LORTTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal profilaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clin Microbiol Rev**, 10(3): 4477-504, 1997.

LUNEL, F.M.V.; MEIS, J.F.G.M.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 34:213-20, 1999.

MAIA, I.G.; BENEDETTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E. e ARRUDA, P. *AtPUMP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Lett.**, 429:403-406, 1998.

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.

MARCO, F.; DANES, C.; ALMELA, M.; JURADO, A.; MENSA, J.; DE LA BELLACASA, J.P.; ESPASA, M.; MARTINEZ, J.A.; JIMÉNEZ DE ANTA, M.T. Trends in frequency and in vitro susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. Results from a six-year study (1996-2001). **Diagn Microbiol Infect Dis**, 46:259-264, 2003.

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**, 9(8): 1062-1068, 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.

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.

MURAYAMA, S.; HANDA, H. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondria uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature. **Mol Gen Genet.**, 264: 112-118, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Aproved standart M27 A2**. National Committe for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2003.

NICHOLLS, D.G. e FERGUSON, S. J. Respiratory Chains. In: NICHOLLS D.G. e FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**. 6a ed. London: Academic Press, 2002-a.p.89-154.

NICHOLLS, D.G. e FERGUSON, S. J. Metabolite and ion transport.. In: NICHOLLS D.G. e FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**. 6a ed. London: Academic Press, 2002-b.p.219-249.

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.

NUCCI, M.. Infecções oportunisticas 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.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 21, 9-14, 1995.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C., HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Clin Microbiol** 39:3254-3259, 2001.

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.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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.

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.

SHIGEMATSU, M.L.; UNO, J.; ARAI, T. Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 21(6): 919-24, 1982.

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 and 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.

SMITH, S.M.; LEE, E.Y.; COBBS, C.J.; ENG, R.H.K. Unusual features of arthritis caused by *Candida parapsilosis* **Arch Path Lab Med.**, 111:71-73, 1987.

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. Empiric treatment of fungal infections in the neutropenic host. **Arch Inter Méd**, 150:2258-64, 1990.

TAKAKURA, S.; FUJIHARA, N.; SAITO, T.; KUDO, T.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. **J Antimicrob Chemother**, 53(2): 283-289, 2004.

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.

VERSECI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, 375:6379-6385, 1995.

VON JAGOW, G.; KLINGENBERG, M. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Sacharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, 12:583-592, 1970.

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.; 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.

WATANABE, A.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 40:1160-1166, 1999.

WATANABE, A.; HIRAI, A. Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa*L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal. *Planta* 215:90-100, 2002.

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 1

Dados da leitura de densidade óptica da curva de crescimento de células 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 2

Dados da leitura da densidade óptica da curva de crescimento de células de *C. parapsilosis* ATCC 22019 as 12, 16 e 36 horas feita com drogas e suas respectivas concentrações em meio YEPG.

Leitura da DO			
	12 horas	16 horas	36 horas
Controle	0,96	2,0	2,53
Fluconazol			
0,05 µg/ml	1,33	1,99	2,25
0,2 µg/ml	1,3	1,92	2,1
0,3 µg/ml	1,19	1,88	2,33
0,6 µg/ml	1,1	1,88	2,16
1,0 µg/ml	1,27	1,91	2,33
2,0 µg/ml	0,99	1,75	1,95
3,0 µg/ml	0,64	0,96	2,0
Cetoconazol			
0,015 µg/ml	0,54	1,1	1,65
0,03 µg/ml	0,38	0,62	0,95
Itraconazol			
0,015 µg/ml	0,3	0,31	0,33
0,03 µg/ml	0,26	0,26	0,26
0,01 µg/ml	0,39	0,54	1,93
0,005 µg/ml	0,55	1,03	2,19
Anfotericina			
0,1 µg/ml	1,0	1,75	2,65
0,3 µg/ml	0,4	0,8	2,4

ANEXO 3

Artigo submetido para publicação na revista Antimicrobiol Agents of Chemoterapy
Candida parapsilosis ATCC 22019 uncoupling protein as a possible target involved in
ketoconazole and fluconazole mechanism of action

Valéria Cristina Faustinoni¹, Jiri Borecký¹, Renata Alves Cavalheiro¹, Aníbal Eugênio Vercesi^{1,*}, and Angélica Zaninelli Schreiber¹

¹Clinical Pathology Department, Faculty of Medical Sciences, State University Of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

***Corresponding author (inclusive proofs): Angélica Z. Schreiber**

Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6111
13084-971 Campinas, SP, Brazil.
Phone: (55-19) 3788-7557
Fax: (55-19) 3788-7510
e-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

Research supported by CNPq/PRONEX (grant No. 66.1192/1997-2), FAPESP (grants No. 98/13012-5 and 00/08019-2). and CAPES.

Key words: *Candida parapsilosis*, growth curve, mitochondria, respiratory chain, antifungal drugs, ketoconazole, fluconazole, uncoupling protein, CpUCP.

ABSTRACT

Current chemotherapy against *Candida* species suffers a number of deficiencies, as low specificity and toxicity. Moreover, there is an alarming increase in reports of microbiological and clinical drug resistances that have been attributed to the presence of branched respiratory pathways in *Candida* energy metabolism. Recently, an uncoupling protein was discovered in this pathogenic yeast. Uncoupling proteins are also associated frequently with cell protection against oxidative stresses, limiting the overproduction of reactive oxygen species. Thus, better understanding of the fungal energy metabolism could be an excellent way to search for new biological targets that could be exploited for the rational development of improved therapies. Here we report a CpUCP accumulation profile during different *Candida parapsilosis* culture growth stages in YEPG medium. CpUCP began to accumulate in *Candida* cells after the culture passed the maximal growth rate. However, in the presence of subinhibitory concentrations of the azolic antifungal agents ketoconazole and fluconazole the CpUCP accumulation was considerably inhibited. Our results suggest that CpUCP may be a new target for antifungal drugs that together with inhibitors of alternative oxidase can resolve the alarming necessity to find new and potent medicaments against systemic candidiases.

[190 words]

INTRODUCTION

Severe fungal infections incidence has increased during the last years and have become a major cause of mortality among immunocompromised patients, including those with AIDS (10, 12). Within years 2001-2003, 2803 *Candida spp.* strains were isolated from patients clinical specimens in Clinics Hospital from The University of Campinas, UNICAMP, Brazil. Among other species, 6% of the strains were identified *C. parapsilosis*, mostly isolated from blood cultures and/or intravenous catheters (1). Current chemotherapy against these fungi suffers a number of deficiencies, as low specificity, toxicity in addition to microbiological and clinical resistance. Mechanisms of action most of systemic antifungal agents is related the reaction with ergosterol (polyenic) or inhibit its synthesis (imidazoles and triazoles) (10), however, there is an alarming increase in reports of drug resistance (25, 27). Better understanding of the fungal cell metabolism could be an excellent way to search for new 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 (23): 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 (6), and high concentrations of salicylhydroxamic acid (SHAM), myxothiazol (9), and KCN (14), and finally iii) the constitutive alternative oxidase (AOx) (16, 31). The high resistance of *C. parapsilosis* to antibiotics (7) has been attributed to the presence of these two alternative electron transfer systems (23).

Another mechanism of cell protection against oxidative stress may involve an uncoupling protein (UCP). The demonstration of various uncoupling protein homologues in plants (2,3, 30) and animals (3, 29) raised the question of their true physiological role (2, 15,19, 20, 29) that should be more general than that of UCP1 - the production of heat in brown adipose tissue of hibernating mammals (26). Evidences have been presented that the new UCPs (22) are involved in cell increasing the rate of respiration and decreasing the production of reactive oxygen species (ROS) (4, 28). The evidence of an UCP-like protein

in *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CpUCP, was recently demonstrated (17). This protein has uncoupling properties, similar to those of the other members of the UCP family but its specific function in the yeast cell is not well defined until now.

The present study demonstrates the expression profile of CpUCP uncoupling protein during different yeast growth stages in YEPG medium and with and without the addition of sub inhibitory concentrations of the azolic antifungal agents ketoconazole and fluconazole.

MATERIAL AND METHODS

Test microorganism

All experiments were performed with *Candida parapsilosis* ATCC 22019, a quality control strain for antifungal susceptibility testing with minimal inhibitory concentrations ranges 0.06-0.25 µg/mL for ketoconazole and 2.0-8.0 µg/mL for fluconazole, as determined by NCCLS M27 A2 document, 2003 (24). The strain was maintained in sterile water and Sabouraud Dextrose Agar (DIFCO).

Control growth curve for determination of inflexion point of exponential growth and CpUCP expression profile in the different stages

Cell cultures were grown in 600 ml of liquid YEPG medium (8) in a shaker at 200 rpm and 37°C for 48 h. Samples containing approximately 100 mg of cells were collected every 1 hour and their optical densities were determined by spectrophotometry at a wavelength of 530 nm (A530). All procedures were repeated twice. The lag phase of the growth was defined as the time, during which the optical density (A530) did not increase. The beginning of the growth was defined as the first time point with a double value of optical density. Stationary growth phase was determined as the lack of an exponential increase in A530. Data were fitted with logistic dose-response model and a maximum growth rate in exponential phase was calculated as its power parameter.

Determination of CpUCP expression in the different stages of growth curve performed with antifungal agents addition

The same growth conditions were used as for the control growth curve, differing only in the previous addition of 0.015 and 0.03 $\mu\text{g/mL}$ of ketoconazole (Jansen) and 2.0 and 3.0 $\mu\text{g/mL}$ of fluconazole (Pfizer) dissolved in DMSO (Merck) and frozen at -20°C until used. Samples containing approximately 100 mg of cells were collected after 12, 16, and 36 hours and their optical densities were determined by spectrophotometry at a wavelength of 530 nm (A530). All procedures were repeated twice.

Protein Isolation

Total protein was isolated using Trizol reagent from the phenol-ethanol supernate obtained after precipitation of DNA. Proteins were precipitate with isopropyl alcohol at 30°C for 10 min, centrifuged at $12,000 \times g$ and 4°C for 10 min. The protein pellet was washed 3-times in a solution containing 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol. During each cycle, protein pellets were incubated with this solution and centrifuged at $7,500 \times g$ and 4°C for 5 min. After the wash, the protein pellet was incubated in ethanol at 30°C for 20 min, centrifuged at $7,500 \times g$ at 4°C for 5 min, dried under vacuum for 5 min, and resuspended in 1% SDS. Protein concentration of the final suspension was determined by Greenberg method (13).

Immunodetection of Candida parapsilosis UCP

Total protein extract (30 μg) from harvested cells of *C. parapsilosis* were separated on a 12% 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-AtPUMPI 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 (Eagle Eye Photo, USA).

Chemicals

Trizol reagent was from Invitrogen, disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decane}-4-yl)phenylphosphate (CSPD) was from Applied Biosystems (Tropix), USA. All other reagents were of analytical grade.

RESULTS

C. parapsilosis culture growth and CpUCP accumulation

Figure 1 demonstrates a typical growth curve of *C. parapsilosis* ATCC 22019 culture. The beginning of exponential culture growth was defined at 8 h 54 min, maximal growth rate in exponential phase was reached at 18 h 31 min, and stationary phase began after 24 hours. The first attempt to characterize a possible physiological role of UCP in yeast was monitoring of its presence and accumulation along the growth of cultured *Candida parapsilosis* cells. Results demonstrated in Figure 1 revealed that CpUCP began accumulate after a culture reached the maximum growth rate; protein accumulation increased proportionally with time. Moreover, a second band of probably different isoform of CpUCP appeared, when the yeast culture entered the stationary phase of culture growth (36 hours).

Effect of antifungal drugs on CpUCP expression

The effect of fluconazole on *Candida parapsilosis* ATCC 22019 culture growth was firstly investigated through a inhibition of culture growth of yeast cells in the presence of various concentrations of fluconazole. In comparison to control culture grown in absence of the drug, the culture growth in the presence of fluconazole was unaffected up to concentration of 1.0 µg/mL and completely inhibited at 4 µg/mL (data not shown). Two intermediate concentrations, 2.0 and 3.0 µg/mL, were found to inhibit partially the cell

culture growth and thus used for subsequent investigation (Fig. 2). Immunodetection of CpUCP in total cellular protein extract from cultures, grown in the presence of 2.0 µg/mL fluconazole, exhibited lowered amounts of CpUCP per mg of total cellular protein extract after 16 hours of the cultivation procedure (Fig 2). In the presence of 3.0 µg/mL fluconazole, no CpUCP was detected after 16-hour cultivation and only traces of CpUCP were detected after yeast cultivation for 36 hours (Fig. 2). No second band occurrence was observed during whole cultivation process.

Similar results were obtained for ketoconazole. The concentrations partially inhibiting the culture growth were found to be 0.015 and 0.03 µg/mL, i.e. 100-fold lower concentration range than that found for fluconazole (Fig. 3). However, the inhibitory effect of ketoconazole on CpUCP accumulation was still more pronounced. The levels of CpUCP in total protein extract from yeast cells, grown in the presence 0.015 µg/mL ketoconazole, were undetectable after 16 hours of yeast cultivation and only traces of CpUCP detected after 36 hours of cultivation (Fig. 3). In the presence of 0.03 µg/mL ketoconazole, the levels of CpUCP were below the detection threshold of western blot technique at all time points tested (Fig. 3), suggesting a high inhibition of CpUCP production.

DISCUSSION

Uncoupling proteins in animals and plants are known to be related to various stresses (4, 11, 21-22). In the case of inferior fungi *C. parapsilosis*, a little is known about the physiological role of its uncoupling protein. Our results suggest the even CpUCP can be related to stress situations because its accumulation in *C. parapsilosis* cells is detectable right after the moment when cells in culture start to compete for nutrients, i.e. at growth phases flowing after the cell culture reached the maximum growth rate.

However, the fungistatic azole antifungal agents, ketoconazole and fluconazole, exert an effect distinct of stress: they seem to act not only as ergosterol synthesis inhibitors; our results suggest the some kind of gene expression shut-down may occur, as seen by lower accumulation of CpUCP during cell culture growth in the presence of these drugs. This can have a great influence on yeast mitochondrial bioenergetics, as uncoupling proteins are considered as regulators/limiters of reactive oxygen species overproduction (2,

28). In other pilot experiments, BHAM, an AOX inhibitor, also prevent *C. albicans* culture growth at concentration of 2 mM that blocks only AOX without affecting the parallel respiratory chain (F. Ruy, A. Kowaltowski, A.Z. Schreiber and A.E. Vercesi, unpublished results).

In conclusion, new insight on antifungal drugs mechanism of action could be emerging, being uncoupling protein a new possible target candidate for azolic compounds. Consequently, a combined administration of antifungal agents with inhibitors of AOX, inexistent in humans and animals, could resolve the alarming necessity to find new and potent medicaments against systemic candidiasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is 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). V.C.F. and R.A.C. are supported by CAPES. J.B. is supported by grant of visiting professor from CNPq (grant No. 305381/02-4 NV).

REFERENCES

1. **Annual Register of Mycoses "Micoteca".** 2003. Dept. Clin. Pathol., Hospital of State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.
2. **Borecký, J., I. G. Maia, and P. Arruda.** 2001. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci. Rep.* **21**:201-211.
3. **Bouillaud, F., E. Couplan, C. Pecqueur, and D. Ricquier.** 2001. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**:107-119.
4. **Brand, M. D., R. Pamplona, M. Portero-Otin, J. R. Requena, S. J. Roebuck, J. A. Buckingham, J. C. Clapham, and S. Cadenas.** 2002. Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J.* **368**:597-603.
5. **Brandalise, M., I. G. Maia, J. Borecky, A. E. Vercesi, and P. Arruda.** 2003. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**:203-209.
6. **Camougrand, N., A. Cheyrou, M. F. Henry, and M. Guérin.** 1988. The alternative respiratory pathway of the yeast *Candida parapsilosis*: oxidation of exogenous NAD(P)H. *J. Gen. Microbiol.* **134**:3195-3204.
7. **Camougrand, N., G. Velours, and M. Guérin.** 1986. Resistance of *Candida parapsilosis* to drugs. *Biol. Cell* **58**:71-78.
8. **Camougrand, N., G. Velours, and M. Guérin.** 1987. The energetic growth yields of the yeast *Candida parapsilosis*. *Biol. Cell* **61**:71-175.
9. **Camougrand, N., S. Zniber, and M. Guérin.** 1991. 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.
10. **Diamond, R. D.** 1991. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.* **13**:480-486.

11. Desikan, R., S. A.-H. Mackerness, J. T. Hancock, and S. J. Neill. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127:159-172.
12. Georgopapadakou, N. H. and J. S. Tkacz. 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* 3:98-104.
13. Greenberg, C. S. and P. R. Craddock. 1982. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin. Chem.* 28:1725-1726.
14. Guérin, M. and N. Camougrand. 1986. The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. *Eur. J. Biochem.* 159:519-524.
15. Hanák, P. and P. Ježek. 2001. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis - UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.* 495:137-141.
16. Helmerhorst, E. J., M. P. Murphy, R. F. Troxler, and F. G. Oppenheim. 2002. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1556:73-80.
17. Jarmuszkiewicz, W., G. Milani, F. Fortes, A. Z. Schreiber, F. E. Sluse, and A. E. Vercesi. 2000. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett.* 467:145-149
18. Jarmuszkiewicz, W., C. M. Sluse-Goffart, L. Hryniewiecka, and F. E. Sluse. 1999. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 274:23198-23202.
19. Ježek, P., A. D. Costa, and A. E. Vercesi. 2000. Important amino acid residues of potato plant uncoupling protein (StUCP). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 12:1413-1420.
20. Ježek, P., A. D. Costa, and A. E. Vercesi. 2000. Important amino acid residues of potato plant uncoupling protein (StUCP). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:1413-1420.
21. Kowaltowski, A. J., A. D. T. Costa, and A. E. Vercesi. 1998. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.* 425:213-216.
22. Mattiasson, G., M. Shamloo, G. Gido, K. Mathi, G. Tomasevic, S. Yi, C. H. Warden, R. F. Castilho, T. Melcher, M. Gonzalez-Zulueta, K. Nikolich, and T.

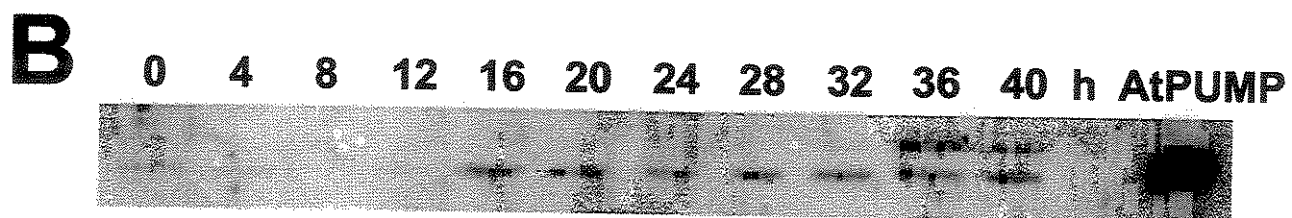
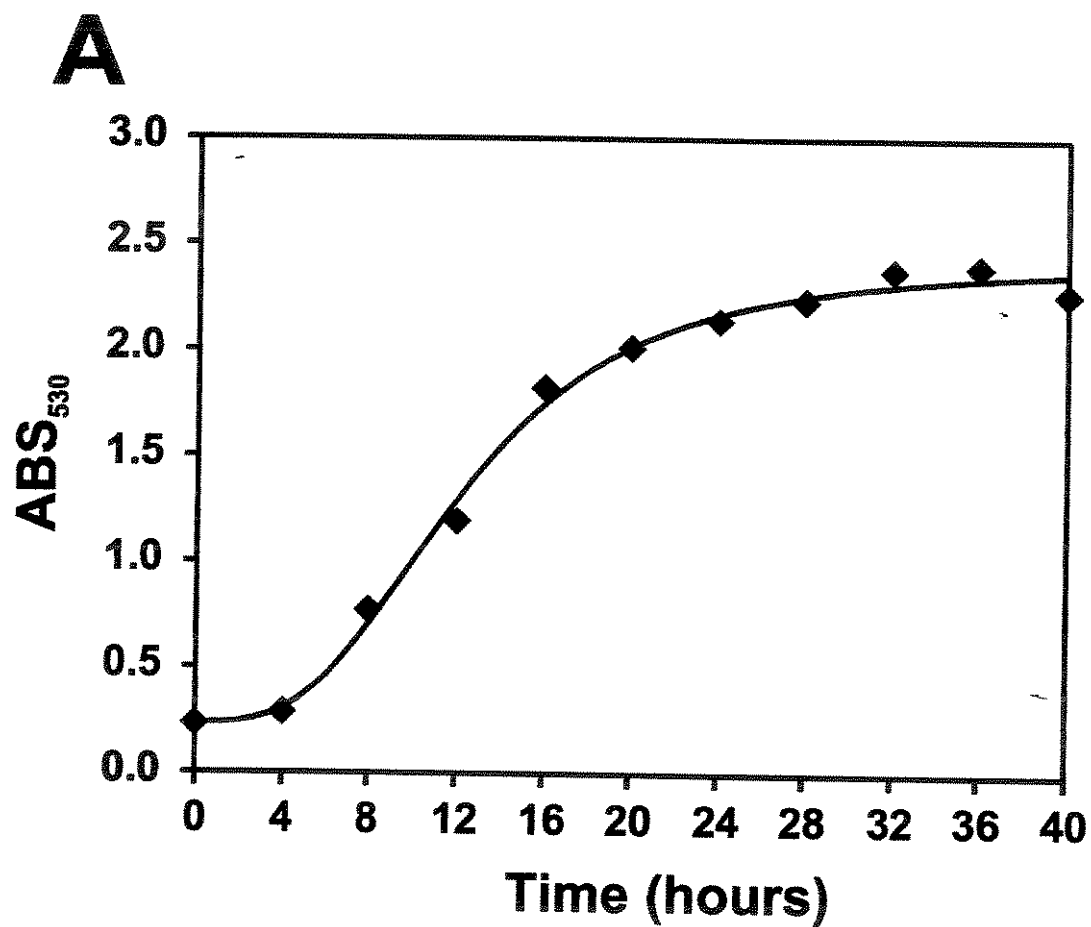
- Wieloch. 2003. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature Med.* **8**:1062-1068
23. Milani, G., W. Jarmuszkiewicz, C. M. Sluse-Goffart, A. Z. Schreiber, A. E. Vercesi, and F. E. Sluse. 2001. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett.* **244**:231-235.
24. National Committee for Clinical Laboratory. 2003. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa..
25. Rex, J. H., G. Rinaldi, and M. A. Pfaller. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1-8.
26. Ricquier, D. and J. C. Kader. 1976. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**:577-583.
27. Sanglard, D. and F. C. Odds. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73-85.
28. Skulachev, V. P. 1998. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**:100-124.
29. Sluse, F. E. and W. Jarmuszkiewicz. 2000. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **3**:259-268.
30. Vercesi, A. E., I. S. Martins, M. A. F. Silva, H. M. F. Leite, I. M. Cuccovia, and H. Chaimovich. 1995. PUMPing plants. *Nature* **375**:24.
31. Wagner, A. M. 1995. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.* **368**:339-342.

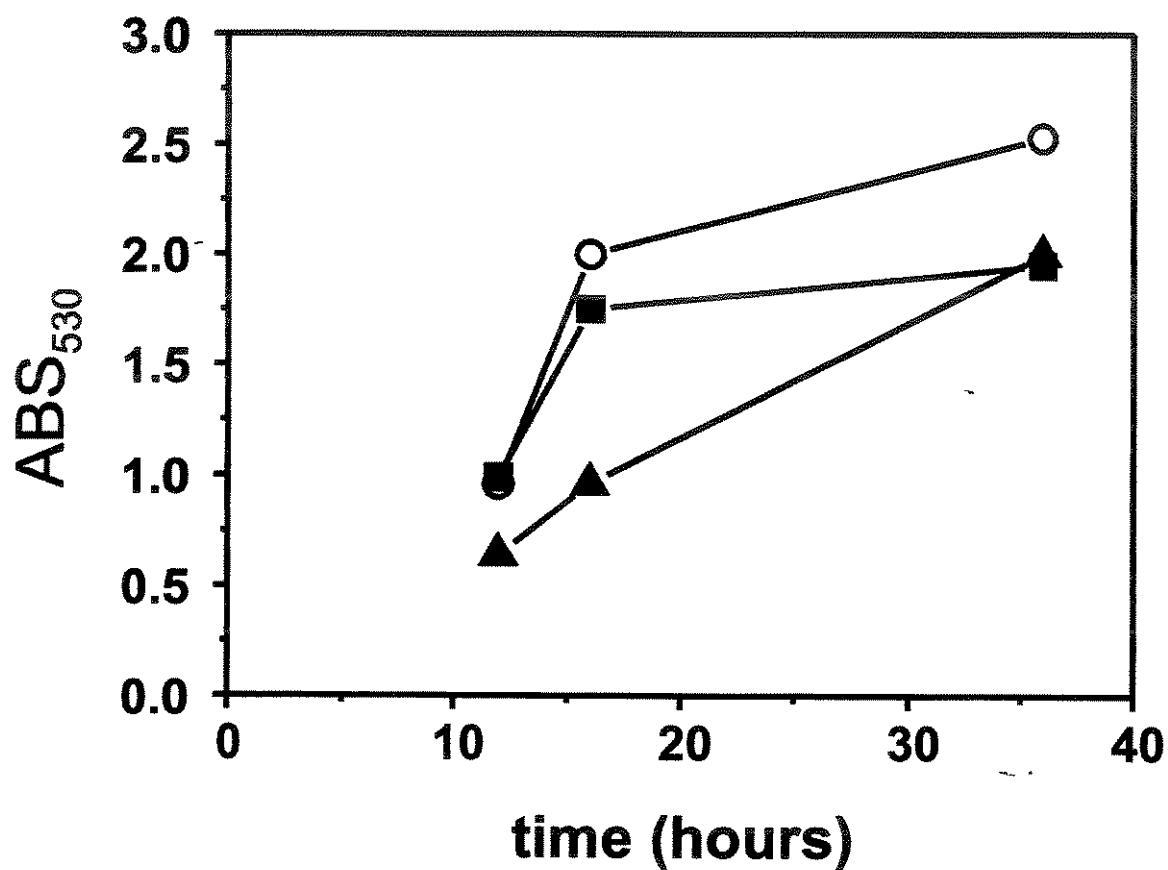
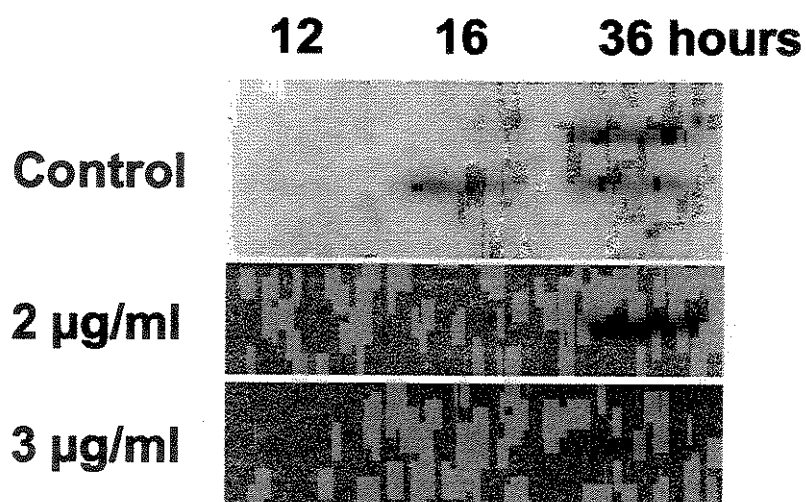
FIGURE LEGENDS

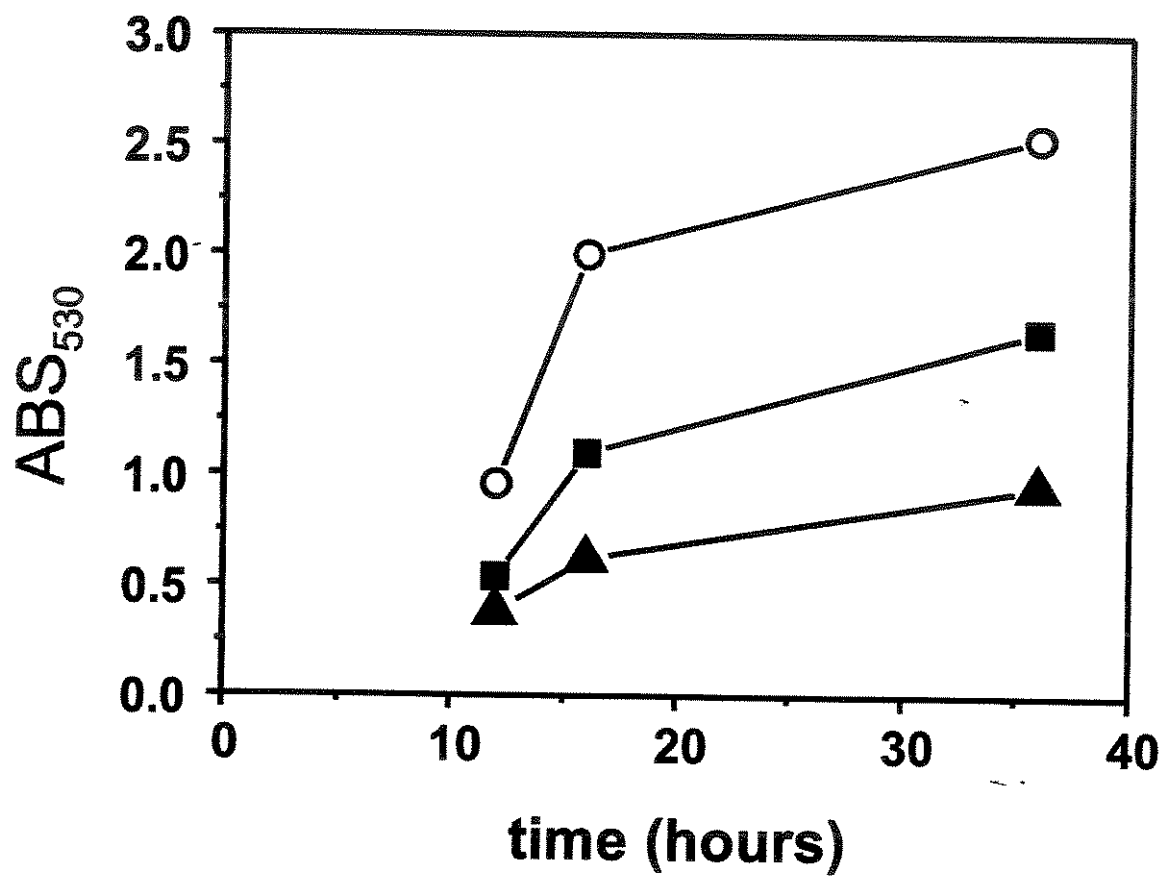
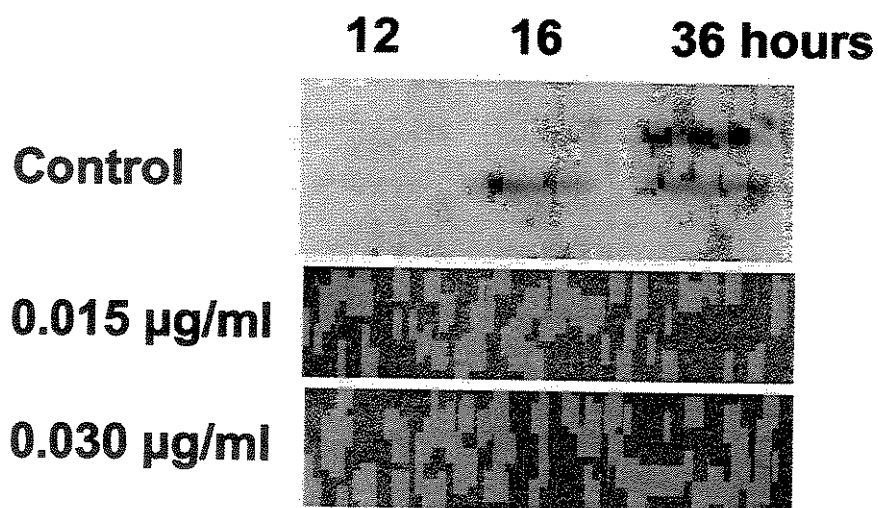
Figure 1: A) *Candida parapsilosis* ATCC 22019 growth curve in YEPG medium at 37°C and 200 rpm; B) Corresponding CpUCP accumulation profile revealed by immunological detection, using *Arabidopsis thaliana* uncoupling protein as a positive control (AtPUMP1).

Figure 2: A) CpUCP expression in respective growth curve conditions: YEPG medium (o), YEPG plus 2.0 µg/mL of fluconazole (■), and YEPG plus 3.0 µg/mL of fluconazole (▲). B) Immunodetection of CpUCP accumulation at 12, 16, and 36 h of culture growth in the absence (control) or the presence of 2.0 µg/mL or 3.0 µg/mL of fluconazole.

Figure 3: A) CpUCP expression in respective growth curve conditions: YEPG medium (o); YEPG plus 0.015 µg/mL of ketoconazole (■); YEPG plus 0.03 µg/mL of ketoconazole (▲). B) Immunodetection of CpUCP accumulation at 12, 16, and 36 h of culture growth in the absence (control) or the presence of 0.015 µg/mL or 0.03 µg/mL of ketoconazole.



A**B**

A**B**

ANEXO 4

Artigo aceito em Bras. J. Med. Biol. Res.

Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*

R.A. Cavaleiro, F. Fortes, J. Borecký, V.C. Faustinoni, A.Z. Schreiber and A.E. Vercesi

¹Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Correspondence

A.E. Vercesi

Departamento de Patologia Clínica

Faculdade de Ciências Médicas

UNICAMP

Caixa Postal 6111

13083-970 Campinas, SP

Brasil

Fax: +55-19-3788-1118

E-mail: anibal@unicamp.br

Research supported by CNPq/PRONEX (No. 66.1192/1997-2), FAPESP (Nos. 98/13012-5 and 00/08019-2), and CAPES. R.A. Cavaleiro and V.C. Faustinoni are supported by

CAPES. F. Fortes is the recipient of a doctoral fellowship from CNPq, and J. Borecký is the recipient of Visiting Professor form CNPq (No. 305381/02-4 NV).

Received November 18, 2003

Accepted

Authors: R.A. Cavaleiro et al.

Running title: *Candida albicans* UCP and oxidative phosphorylation

Abstract

The respiration, membrane potential ($\Delta\Psi$), and oxidative phosphorylation of mitochondria *in situ* were determined in spheroplasts obtained from *Candida albicans* control strain ATCC 90028 by lyticase treatment. Mitochondria *in situ* were able to phosphorylate externally added ADP (200 μ M) in the presence of 0.05% bovine serum albumin. Mitochondria *in situ* generated and sustained stable mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) respiring on 5 mM NAD-linked substrates, 5 mM succinate, or 100 μ M N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride plus 1 mM ascorbate. Rotenone (4 μ M) inhibited respiration by 30% and 2 μ M antimycin A or myxothiazole and 1 mM cyanide inhibited it by 85%. Cyanide-insensitive respiration was partially blocked by 2 mM benzohydroxamic acid, suggesting the presence of an alternative oxidase. *Candida albicans* mitochondria *in situ* presented a carboxyatractyloside-insensitive increase of $\Delta\Psi$ induced by 5 mM ATP and 0.5% bovine serum albumin, and $\Delta\Psi$ decrease induced by 10 μ M linoleic acid, both suggesting the existence of an uncoupling protein. The presence of this protein was subsequently confirmed by immunodetection and respiration experiments with isolated mitochondria. In conclusion, *Candida albicans* ATCC 90028 possesses an alternative electron transfer chain and alternative oxidase, both absent in animal cells. These pathways can be exceptional targets for the design of new chemotherapeutic agents. Blockage of these respiratory pathways together with inhibition of the uncoupling protein (another potential target for drug design) could lead to increased production of reactive oxygen species, dysfunction of *Candida* mitochondria, and possibly to oxidative cell death.

Key words: *Candida albicans* spheroplasts, Mitochondria, Respiratory chain, Mitochondrial membrane potential, Uncoupling protein

Introduction

Candidiases are common infections of the skin, oral cavity, esophagus, gastrointestinal tract, vagina, and vascular system, and have become a major cause of mortality in immunocompromised patients, including those with AIDS (1-3) or debilitated in some other way (4). From 2001 to 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%), and *C. krusei* (3.4%), and 10.6% belonged to other yeast genera (5). The chemotherapy currently used against these fungi has a number of deficiencies such as low specificity, toxicity, and drug resistance. Most antifungal drugs react with ergosterol or inhibit its production (6); however, there is an alarming increase in 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 but inhibited by amytal (9) and by high concentrations of salicylhydroxamic acid (SHAM), myxothiazol (10), and KCN (11), and finally iii) the constitutive alternative oxidase (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 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.

Another mechanism of cell protection against oxidative stress may involve the recently described isoforms of uncoupling protein (UCP; now UCP1 (15)). The demonstration of various uncoupling protein homologues in plants (16-18) and animals

(17-18) raised the question of their true physiological role (18-21) that should be more general than that of UCP1 - the production of heat in brown adipose tissue of hibernating mammals (15). Evidence has been presented that the new UCPs are involved in cell defense against oxidative stress (22-27). They are able to induce mild uncoupling, thus increasing the rate of respiration and decreasing the production of reactive oxygen species (ROS) (24-27).

A UCP was also detected recently in *Candida parapsilosis* (28). Therefore, it is of great interest to study *C. albicans* UCP in order to understand its role in the ability of these cells to resist stress. In the present study, we demonstrated that spheroplasts obtained from cultures of *C. albicans* in 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) (28).

Material and Methods

C. albicans

C. 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 (BD (Difco), Franklin Lakes, NJ, USA). The cell cultures were grown in YEPG medium (29) at 37°C and 200 rpm. To determine the inflexion point of exponential growth, samples were collected at 1-h intervals and culture density was determined spectrophotometrically at 530 nm. Experimental points were fitted using a logistic dose-response model and the maximum growth rate during the exponential phase was calculated as its power parameter.

Spheroplast preparation

One liter of culture was harvested by centrifugation for the standard preparation (29) and cells were washed once with cold water and once with buffer A (1 M sorbitol, 10 mM MgCl₂, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.8). Cells were resuspended in buffer A (3 ml/g of cells) supplemented with 30 mM dithiothreitol (DTT). After 15 min at room temperature

with shaking, cells were harvested, resuspended in buffer A containing lyticase (1 mg/g of cells) and 1 mM DTT, and incubated at 30°C until about 90% of cells were converted to spheroplasts (~60 min). The reaction was stopped with an equal volume of ice-cold buffer A, and spheroplasts were washed twice with buffer A. The protein concentration of the final suspension was determined by the biuret method (30) in the presence of 0.2% deoxycholate.

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 broken mechanically using a Dounce homogenizer with a maximum of 10 strokes and cell debris were removed by centrifugation at 1,000 g for 10 min. Mitochondria were pelleted by 10-min centrifugation at 10,500 g and washed with buffer B₂ (0.6 M mannitol, 1 mM EDTA, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.0). The last wash was made in buffer B₂ medium without BSA and EDTA (28) and mitochondrial protein concentration was determined by the biuret method (30).

Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) of permeabilized cells was monitored by measuring the fluorescence spectrum of safranin O with a Hitachi F4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) at excitation emission wave length of 495-586 nm (31). All experiments were performed at 28°C in 2 ml of standard incubation medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM KH₂PO₄, and 1 mM MgCl₂, plus 1 mg of mitochondrial protein.

Oxygen uptake

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

Immunodetection of *Candida albicans* UCP

Fifty micrograms of total proteins extracted from spheroplasts prepared from cultures of *C. albicans* and *C. parapsilosis* (positive control) were separated on 10% polyacrylamide gel by standard SDS-PAGE. Protein bands were transferred to a nylon membrane (Hybond N) with a semi-dry blotting apparatus (Amersham Biosciences AB (Pharmacia) Uppsala, Sweden). 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 an 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 12.5 μ M CSPD for 5 min. The bands were visualized by autoradiography and scanned with the Eagle-Eye photo documentation system (Eagle Eye Photo, Homer, AK, USA).

Chemicals

ATP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), succinate, ethylene ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), antimycin A, myxothiazol, carboxyatractyloside (CAT), BSA, linoleic acid, KCN, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD), and lyticase were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decane}-4-yl]phenylphosphate (CSPD) was from Tropix (Applied Biosystems (Tropix), Foster City, CA USA). All other reagents were of analytical grade.

Results and Discussion

In the present study we characterized mitochondrial bioenergetic pathways in *C. albicans* ATCC 90028 using a method previously applied to *C. parapsilosis* (29).

In order 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 $\Delta\Psi$ by oxidizing different respiratory substrates. Figure 1 shows that spheroplasts prepared from cell cultures grown to the middle exponential phase were permeable to

mitochondrial substrates and inhibitors without affecting the functional integrity of the spheroplast mitochondria. These spheroplast mitochondria suspended *in situ* in reaction medium containing a cocktail of NAD-linked substrates generated and sustained a stable membrane potential and respiration rate of 43 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹ (Figure 1). The subsequent inhibition of Complex I by 4 μM rotenone resulted in a decrease of about 30% in the respiration rate (29 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹) and ΔΨ. This suggests a significant contribution of this complex to ΔΨ generation, in agreement with the results obtained by Helmerhorst et al. (13). They 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 ΔΨ but total oxygen consumption level was unchanged (29 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹). The increase in ΔpH by succinate addition was certainly the consequence of an increased electron flux through the classic respiratory pathway (coupled respiration - the only one that increases ΔpH⁺) associated with some alteration in the partitioning of electrons among the three respiratory pathways (classic, parallel, and *via* alternative oxidase) present in *Candida* yeast (13), resulting in a decrease in electron flux through the uncoupled pathways. Therefore, the total respiration rate was not modified by the addition of succinate. Blockage of complex III by 2 μM antimycin A or 2 μM myxothiazol promoted collapse of ΔΨ and a reduction of more than 90% in respiration (4 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹). Addition of 100 μM TMPD/1 mM ascorbate restored the respiration rate (28 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹). Finally, inhibition of complex IV by 1 mM KCN was accompanied by a complete loss of ΔΨ and by a decrease of about 85% in respiration rate (6 nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹). Drastic changes in ΔΨ after inhibition of complexes III and IV suggest the essential role of these complexes in energy conservation by *C. albicans* mitochondria. The CN-insensitive respiration was inhibited by 2 mM benzohydroxamic acid (BHAM), suggesting the presence of alternative oxidases, as previously described (8,13). In contrast, Helmerhorst et al. (13) reported that respiration by *C. albicans* ATCC 10231 cells was almost insensitive to 5 mM SHAM when grown in the absence of antimycin A. On the other hand, respiration by cells grown in the presence of 10 μM antimycin A was completely inhibited by 5 mM SHAM, indicating that the alternative pathway was the only pathway utilized by *C. albicans* mitochondria when the classical cytochrome pathway was inhibited at the cytochrome *c* oxidase level.

An uncoupling protein, another energy-dissipating system that can also modulate $\Delta\Psi$ and the respiration rate, was recently identified in the fungus kingdom as CpUCP from *C. parapsilosis* (28). Interestingly, UCP is absent from *Saccharomyces cerevisiae* (33). In the present study, the existence of a CpUCP homologue (CaUCP) was also detected in *C. albicans* mitochondria by immunoblot analysis using anti-AtPUMP1 antibody (34) and CpUCP (line Cp) as a positive control. The immunoblot revealed 2 protein bands of about 32 kDa (Figure 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 observed in mammals and plants (17-18,35).

Uncoupling proteins are known to be activated by free fatty acids (FFAs) and inhibited by ATP (36-39). Accordingly, *in situ* $\Delta\Psi$ measurements in *C. albicans* mitochondria demonstrated an increase of $\Delta\Psi$ after consecutive additions of 5 mM ATP and 0.5% BSA, which binds non-covalently FFAs (Figure 3A, trace b) as compared to control experiments without additions (line a). 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, the addition of linoleic acid caused a decrease in $\Delta\Psi$ that was reversed by BSA (Figure 3B, trace e), reaching levels higher than control at the end (trace d), probably because BSA also binds the endogenous FFAs. These experiments were performed in the presence of 1 μ M carboxyatractyloside (CAT) to prevent the contribution of the ADP/ATP carrier to the FFA-induced H^+ re-uptake through FFA anion translocation (23). Indeed, it is known that the ADP/ATP carrier in the absence of its substrates ADP and ATP can translocate FFA (23). In addition, the presence of glutamate, pyruvate, and malate/ α -ketoglutarate prevented fatty acid anion transport through the corresponding carriers (23).

Accordingly, 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 linoleic acid, whereas state 4 respiration, observed after ADP phosphorylation, was stimulated by about 75% (Figure 4). These results mean that the linoleic acid-induced H^+ recycling can efficiently divert energy from oxidative phosphorylation in state 3 respiration even if the state 3 respiration rate is not modified, in agreement with Jarmuszkiewicz et al. (28). Therefore, the observed

uncoupling of oxidase phosphorylation caused by linoleic acid can be attributed to CaUCP. Figure 5 shows that, in the presence of ATP and BSA, *C. albicans* mitochondria can efficiently phosphorylate ADP *in situ*, as indicated by the transient $\square\square$ decrease induced by the addition of ADP.

The presence of uncoupling protein in *Candida* ssp. implies a role of this protein in yeast mitochondrial energy metabolism and raises the possibility of its involvement in cell protection against ROS overproduction. This protective role against ROS has been described for UCP2 (22) and UCP3 (25). Mitochondria from underexpressing mice had significantly higher levels of oxidative damage than wild-type controls (26). In plants, leaf discs of transgenic tobacco plants overexpressing *AtPUMP1* showed a increase in the tolerance to oxidative stress promoted by exogenous hydrogen peroxide compared to wild-type control plants (24).

The presence in *C. albicans* of an alternative electron transfer chain (13) and alternative oxidase (39) absent in animal cells offers exceptional targets for the design of new chemotherapeutic agents. Blockage of these respiratory pathways and/or inhibition of the uncoupling protein (another target for drug design) could lead to mitochondrial dysfunction, increased production of ROS, and possibly to cell death.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. R. Docampo, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA for a critical reading of the manuscript.

References

1. Georgopapadakou NH & Tkacz JS (1995). The fungal cell wall as a drug target. *Trends in Microbiology*, 3: 98-104.
2. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi G, Polak A & Galgiani JN (1993). Antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology*, 6: 367-381.
3. Sanglard D & Odds FC (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, 2: 73-85.
4. Calderone RA & Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9: 327-335.
5. Annual Register of Mycoses "Micoteca", Departamento de Patologia Clínica, Hospital da Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil.
6. Diamond RD (1991). The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Reviews of Infectious Diseases*, 13: 480-486.
7. Rex JH, Rinaldi G & Pfaller MA (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1-8.
8. Milani G, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Schreiber AZ, Vercesi AE & Sluse FE (2001). Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Letters*, 508: 231-235.
9. Camougrand N, Cheyrou A, Henry MF & Guérin M (1988). The alternative respiratory pathway of the yeast *Candida parapsilosis*: oxidation of exogenous NAD(P)H. *Journal of General Microbiology*, 134: 3195-3204.
10. Camougrand N, Zniber S & Guérin M (1991). The antimycin-A-insensitive respiratory pathway of *Candida parapsilosis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1057: 124-130.
11. Guérin M & Camougrand N (1986). The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. *European Journal of Biochemistry*, 159: 519-524.

12. Wagner AM (1995). A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Letters*, 368: 339-342.
13. Helmerhorst EJ, Murphy MP, Troxler RF & Oppenheim FG (2002). Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1556: 73-80.
14. Camougrand N, Velours G & Guérin M (1986). Resistance of *Candida parapsilosis* to drugs. *Biology of the Cell*, 58: 71-78.
15. Ricquier D & Kader JC (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73: 577-583.
16. Vercesi AE, Martins IS, Silva MAF, Leite HMF, Cuccovia IM & Chaimovich H (1995). PUMPing plants. *Nature*, 375: 24.
17. Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C & Ricquier D (2001). Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504: 107-119.
18. Borecký J, Maia IG & Arruda P (2001). Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Bioscience Reports*, 21: 201-211.
19. Sluse FE & Jarmuszkiewicz W (2000). Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 259-268.
20. Hanák P & Ježek P (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis - UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Letters*, 495: 137-141.
21. Ježek P, Costa AD & Vercesi AE (2000). Important amino acid residues of potato plant uncoupling protein (StUCP). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 1413-1420.
22. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G et al. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature Medicine*, 8: 1062-1068.

23. Skulachev VP (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1363: 100-124.
24. Brandalise M, Maia IG, Borecký J, Vercesi AE & Arruda P (2003). Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35: 203-209.
25. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY et al. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 16258-16266.
26. Brand MD, Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Roebuck SJ, Buckingham JA, Clapham JC & Cadenas S (2002). Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochemical Journal*, 368: 597-603.
27. Camougrand N, Velours G & Guerin M (1987). The energetic growth yields of the yeast *Candida parapsilosis*. *Biology of the Cell*, 61: 171-175.
28. Jarmuszkiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber AZ, Sluse FE & Vercesi AE (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Letters*, 467: 145-149.
29. Milani G, Schreiber AZ & Vercesi AE (2001). Ca^{2+} transport into an intracellular acidic compartment of *Candida parapsilosis*. *FEBS Letters*, 500: 80-84.
30. Gornall AG, Bardawill CJ & David MJ (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Biological Chemistry*, 177: 751-757.
31. Fortes F, Castilho RF, Catisti R, Carnieri EGS & Vercesi AE (2001). Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33: 43-51.
32. Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L & Sluse FE (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 23198-23202.

33. ElMoualij B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J & Sluse FE (1997). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13: 573-581.
34. Borecký J, Maia IG, Costa ADT, Ježek P, Chaimovich H, Andrade PMB, Vercesi AE & Arruda P (2001). Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 505: 240-244.
35. Žáčková M & Ježek P (2002). Reconstitution of novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Bioscience Reports*, 22: 33-47.
36. Ježek P, Engstová H, Zachová M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P & Garlid KD (1998). Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 365: 319-327.
37. Jabůrek M, Vařecha M, Gimeno RE, Dembski M, Ježek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA & Garlid KD (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 26003-26007.
38. Ježek P, Costa ADT & Vercesi AE (1996). Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 32743-32748.
39. Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Vercesi AE & Sluse FE (2001). Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance. *Bioscience Reports*, 21: 213-222.

Figure legends

Figure 1. Effect of substrates and inhibitors on *Candida albicans* spheroplast oxygen consumption (A) and mitochondrial membrane potential (B). *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 the substrates 5 mM succinate and 100 μ M TMPD/ascorbate (TMPD), and the 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 the arrows. Numbers on the trace indicate O_2 consumption rates in $nmol\ O_2\ min^{-1}\ mg\ protein^{-1}$. TMPD = tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride; BHAM = benzohydroxamic acid.

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

Figure 3. Effect of ATP and BSA (A) or LA (B) on mitochondrial $\Delta\Psi$ of *Candida albicans* spheroplasts in the presence of 1 μ M CAT. Spheroplasts (1 mg/ml) were added to standard medium containing 5 mM substrate cocktail and 5 μ M safranine O. Additions of 5 mM ATP (line b), 0.5% BSA (line b and e), 10 μ M LA (line e), and 1 μ M FCCP are indicated by the arrows. Lines (a) and (d) are controls without additions and line (c) is a control with ATP and BSA present from the beginning of the experiment. BSA = bovine serum albumin; CAT = carboxyatractyloside; $\Delta\Psi$ = membrane potential; FCCP = carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; LA = linoleic acid.

Figure 4. Effect of linoleic acid (LA) on oxidative phosphorylation. *Candida albicans* mitochondria (1 mg/ml) were added (as indicated by the arrow at "mito") to 1.3 ml standard incubation medium (28°C) with 5 mM substrate cocktail (malate, glutamate, pyruvate, and α -ketoglutarate) and 200 μ M ADP in the absence or in the presence of 2 μ M LA (+LA) (linoleic acid). The numbers on the traces indicate O_2 consumption rates in $nmol\ O_2\ min^{-1}\ mg\ protein^{-1}$. RC = respiratory control; ADP/O = ADP/O ratio.

Figure 5. ADP phosphorylation by *C. albicans* spheroplast mitochondria. Spheroplasts (1.0 mg/ml) were incubated in reaction medium containing 5 mM substrate cocktail (malate, glutamate, pyruvate, and α -ketoglutarate), 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. FCCP = carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone.

