

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DENISE MOTTA WANDERLEY ZILLI

**CATABOLISMO DA TREALOSE EXTRACELULAR E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA TREALASE ÁCIDA DE
*Candida glabrata***

**Florianópolis
2006**

DENISE MOTTA WANDERLEY ZILLI

***CATABOLISMO DA TREALOSE EXTRACELULAR E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DA TREALASE ÁCIDA DE
Candida glabrata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Miletti

Florianópolis
2006

**“CATABOLISMO DA TREALOSE EXTRACELULAR E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DA TREALASE ÁCIDA DE *Candida glabrata*”**

POR

DENISE MOTTA WANDERLEY ZILLI

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Miletto

Prof. Dr. Hector Terenzi

Prof. Dr. Mário Stendel
MIP/CCB/UFSC

Prof. Dr. Nelson Horácio Gabilan
BQA/CCB/UFSC

Prof. Dr. Mário Stendel - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, julho de 2006.

**Dedico este trabalho ao meu
marido Daniel e a minha filha
Gabriela.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Boris U. Stambuk que com sabedoria e profissionalismo conduziu a orientação deste trabalho, esclarecendo minhas incontáveis dúvidas e despertando outras tantas. Agradeço pela oportunidade do aprendizado e por sua amizade.

Ao professor Cláudio Miletti, pelo companheirismo e cumplicidade nos experimentos, por sua contribuição intelectual.

Ao Prof. Hernán Terenzi pelos empréstimos de seus equipamentos e pela doação de alguns reagentes. Ao Prof. Nelson Gabilan que gentilmente liofilizou as amostras e à Profa. Andréa Villarino, que com grande generosidade e conhecimento, acompanhou-me nos passos de purificação protéica.

Aos colegas do laboratório Fernanda, Ricardo, Marcelo, Débora, Sérgio, Maria Luíza e Fábio pela amizade e solidariedade.

A coordenação, aos professores do curso e a secretaria pelo apoio e esclarecimentos prestados ao longo desses dois anos.

Ao meu marido Daniel que me ajudou durante esta trajetória, agradeço seu incentivo e sua confiança.

A Gabriela, pela compreensão de minha ausência e por seu companheirismo, mesmo que virtual (na tela de descanso do computador), durante a escrita dessa dissertação.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram, mostrando interesse pelas minhas realizações e conquistas.

E, ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A levedura *Candida glabrata* tem sido apontada como importante patógeno emergente, sendo a segunda espécie mais comumente envolvida na etiologia das candidíases, infectando principalmente indivíduos imunodeficientes e imunocomprometidos. Devido à resistência natural aos antifúngicos azólicos e à alta taxa de mortalidade associada a *C. glabrata*, os testes rápidos para sua identificação constituem importante ferramenta para a escolha terapêutica. Este microrganismo se destaca da maioria das leveduras por ser capaz de apenas consumir dois açúcares: a glicose e o dissacarídeo trealose (Gli α 1-1 α Gli). De fato, os testes rápidos de identificação têm como princípio justamente a habilidade desta levedura em hidrolisar as moléculas de trealose em duas de glicose. Dada a importância da metabolização da trealose para *C. glabrata*, no presente trabalho foi realizada uma caracterização bioquímica do catabolismo de trealose por esta levedura. Nossos resultados mostram que *C. glabrata* consome e fermenta eficientemente a trealose presente no meio de cultura, com parâmetros cinéticos e produtividades de biomassa e etanol semelhantes aos observados durante a fermentação da glicose. De fato, o crescimento em trealose não foi afetado pelo inibidor mitocondrial antimicina A, confirmando a eficiente fermentação deste dissacarídeo por *C. glabrata*. Na fase exponencial de crescimento em trealose foi detectado acúmulo de até 2,5 g/L de glicose no meio, indicando a possível hidrólise extracelular do dissacarídeo. A análise de uma possível atividade trealase na superfície das células revelou a presença de uma trealase ácida com um pH ótimo de 4,4. Esta enzima é sintetizada durante o crescimento em trealose, mas este açúcar não é aparentemente o indutor da atividade uma vez que níveis altos da enzima foram detectados também após o crescimento em glicerol, o mesmo ocorrendo durante a desrepressão das células após o consumo da glicose. Nossos resultados mostram também que *C. glabrata* secreta a trealase ácida para o meio de cultura, sendo que aproximadamente 30% da atividade enzimática total é secretada após o crescimento em trealose ou glicerol. A trealase ácida secretada para o meio de cultura apresenta uma massa molecular aparente, deduzida por filtração em gel, de 275 kDa na sua forma ativa. Entretanto, a análise de proteínas através de eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) revelou uma proteína com massa molecular aparente de aproximadamente 130 kDa, que pelo padrão de migração e forte ligação à lectina concanavalina A, indica tratar-se de uma glicoproteína. Esta glicoproteína apresenta uma massa molecular coincidente com o peso teórico da proteína codificada pelo gene *CAGLOK05137g* de *C. glabrata*, gene com ~60% de homologia a outras trealases ácidas de leveduras, sugerindo que a enzima ativa seja um dímero. A trealase ácida secretada por *C. glabrata* apresentou alta afinidade pela trealose, com valores de K_m e V_{max} de 3,4 mM e 80 U (mg de proteína)⁻¹, respectivamente, além de possuir relativa estabilidade, mostrando-se altamente específica para seu substrato, a trealose.

Palavras-chave: Catabolismo. Trealose. Trealase ácida. *C. glabrata*.

ABSTRACT

The yeast *C. glabrata* has been recognized as an important emergent pathogen, and is considered the second most common cause of candidiasis, infecting predominantly immunodeficient and immunocompromised patients. Due to its low sensitivity to antifungal azoles and high mortality, rapid identification tests are important in order to choose the appropriate therapeutic treatment. This microorganism differs from other yeasts because it assimilates only two sugars: glucose and the disaccharide trehalose (Glu α 1-1 α Glu). Indeed, the rapid identification tests are based on the ability of this yeast to hydrolyze trehalose into two molecules of glucose. Due to the importance that trehalose metabolism has for *C. glabrata*, in this work a biochemical characterization of trehalose catabolism by this yeast was performed. Our results show that *C. glabrata* consumes and ferments efficiently the trehalose present in the medium, with kinetic parameters and biomass and ethanol productivities similar to those observed during glucose fermentation. Indeed, growth on trehalose was not affected by the mitochondrial inhibitor antimycin A, confirming the efficient fermentation of this disaccharide by *C. glabrata*. During the exponential growth phase on trehalose up to 2.5 g/L of glucose was accumulated in the medium, suggesting the possible extracellular hydrolysis of the disaccharide. The analysis of a putative trehalase activity at the cell surface revealed the presence of an acid trehalase with pH optimum of 4.4. This enzyme is synthesized during growth on trehalose, but this sugar seems not to be an inducer of the activity as high levels of this enzyme were also detected after growth on glycerol, the same occurring during the derepression of the cells after glucose consumption. Our results also indicate that *C. glabrata* secretes the acid trehalase into the medium, and approximately 30% of the total enzymatic activity is secreted after growth on trehalose or glycerol. The acid trehalase secreted into the culture medium shows an apparent molecular mass, deduced by gel filtration, of 275 kDa in its native form. However, the analysis of proteins by denaturant gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed a protein with a molecular mass of approximately 130 kDa, which due to its migration pattern and strong binding to concanavalin A, indicates is a glycoprotein. This glycoprotein has a molecular mass coincident with the theoretical weight of the protein encoded by the *C. glabrata* CAGLOK05137g gene, a gene with ~60% of homology with other yeast acid trehalases, suggesting that the active enzyme is a dimer. The acid trehalase secreted by *C. glabrata* shows a relative high affinity for trehalose, with K_m and V_{max} values of 3.4 mM and 80 U (mg of protein)⁻¹, respectively. In addition, this enzyme was relatively stable, and seem to be highly specific for its substrate, trehalose.

Key-words: Catabolism. Trehalose. Acid Trehalase. *C. glabrata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura IV.1. Efeito da Antimicina A no crescimento de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> em trealose.....	38
Figura IV.2. Crescimento de <i>C. glabrata</i> e <i>C. albicans</i> em glicose.....	39
Figura IV.3. Crescimento de <i>C. glabrata</i> e <i>C. albicans</i> em trealose.....	40
Figura IV.4. Crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio mínimo com glicose.....	42
Figura IV.5. Crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio mínimo com trealose.....	43
Figura IV.6. Efeito do pH na atividade trealase em células íntegras de <i>C. glabrata</i>	45
Figura IV.7. Análise cinética da atividade trealase em células íntegras de <i>C. glabrata</i>	46
Figura IV.8. Efeito do pré-crescimento em diferentes fontes de carbono na capacidade de <i>C. glabrata</i> catabolizar a trealose.....	48
Figura IV.9. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio rico YP contendo 2% glicose como fonte de carbono.....	49
Figura IV.10. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio rico YP contendo 2% trealose como fonte de carbono.....	51
Figura IV.11. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio rico YP contendo 3% glicerol como fonte de carbono.....	52
Figura IV.12. Atividade trealase extracelular ao longo do crescimento da linhagem LEMI 8228 em meio rico YP contendo 3% glicerol como fonte de carbono.....	55
Figura IV.13. Cromatograma do sobrenadante de cultura analisado por filtração em gel em coluna Superdex S-200.....	56
Figura IV.14. Determinação da massa molecular da fração com atividade trealase secretada por <i>C. glabrata</i>	58

Figura IV.15. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações com atividade trealase eluídas da filtração em gel.....	59
Figura IV.16. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações vizinhas às com atividade trealase eluídas da filtração em gel.....	60
Figura IV.17. Cromatograma de uma outra amostra de sobrenadante de cultura analisado por filtração em gel em coluna Superdex S-200.....	61
Figura IV.18. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações com atividade trealase eluídas da filtração em gel em Superdex S-200 mostrada na Figura IV.17.....	62
Figura IV.19. Análise cinética da atividade trealase extracelular de <i>C. glabrata</i>.....	64
Figura IV.20. Construção do módulo de deleção do gene <i>CAGLOK05137g</i> de <i>C. glabrata</i>	67
Figura V.1. Alinhamento da sequência de aminoácidos das trealases ácidas de <i>C. glabrata</i>, <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. albicans</i>.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1. Cepas de levedura estudadas.....	30
Tabela III.2. Oligonucleotídeos utilizados.....	36
Tabela IV.1. Comparação da atividade trealase celular e secretada por algumas cepas de <i>C. glabrata</i> crescidas em glicose, trealose ou glicerol.....	53
Tabela IV.2. Especificidade da Trealase extracelular de <i>C. glabrata</i>.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT1	trealase ácida de <i>C. albicans</i>
AGT1	transportador α - glicosídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
K_M	constante de Michaelis-Menten
LEMI	Laboratório Especial de Micologia UNIFESP
MIC	concentração inibitória mínima
NTH1	trealase neutra
OPC	candidíase de orofaringe
PCR	reação em cadeia da polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SNF1	Sucrose Non-Fermenting 1
TPS1	trealose 6-fosfato sintase
TreA	trealase ácida de <i>A. nidulans</i>
YNB	yeast nitrogen base (meio mínimo)
YP	yeast peptone (meio rico)

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	13
I.1 <i>Candida glabrata</i>	13
I.2 Manifestações clínicas e epidemiologia das Candidíases	15
I.2.1 Infecções superficiais por <i>Candida</i>	15
I.2.2 Forma invasiva ou sistêmica das infecções por <i>Candida</i>	16
I.3 Fatores de virulência para <i>C. glabrata</i>	19
I.4 Diagnóstico laboratorial das infecções por <i>C. glabrata</i>	21
I.5 Metabolização de Trealose por leveduras	25
I.5.1 Catabolismo da trealose	26
II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	29
III MATERIAL E MÉTODOS	30
III.1 Cepas utilizadas	30
III.2 Meios e condições de cultivo	31
III.3 Determinação de glicose, trealose e etanol	31
III.4 Determinação da atividade trealase	32
III.5 Dosagem de proteínas	33
III.6 Técnicas de purificação de proteínas	33
III.6.1 Preparação das amostras	33
III.6.2 Filtração em gel	33
III.6.3 Coluna de afinidade com lectina	34
III.7 Eletroforese de proteínas	34
III.8 Técnicas de Biologia Molecular	35
IV RESULTADOS	36
V DISCUSSÃO	69
VI CONCLUSÃO	77
VII REFERÊNCIAS	79
ANEXO A – Identificação das principais leveduras de interesse clínico	94

I INTRODUÇÃO

I.1 *Candida glabrata*

C. glabrata, junto com as demais espécies de *Candida*, pertence à classe dos Fungos Imperfeitos, ordem Moniliales, família Cryptococcaceae. *C. glabrata* é encontrada sob uma única forma, a de levedura, que se reproduz assexuadamente por brotamento, sem nenhum ciclo sexual conhecido. Esta levedura foi isolada de fezes humanas em 1917, e recebeu a denominação de *Cryptococcus glabrata*. Em 1938, Lodder e De Vries transferiram-na para o gênero *Torulopsis*. Entretanto, em 1978, quando se determinou que a habilidade de produzir pseudo-hifa não seria um critério de distinção dos membros pertencentes ao gênero *Candida*, foi sugerida a reclassificação de *T. glabrata* dentro do gênero *Candida* (LACAZ et al., 1991; FIDEL et al., 1999).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, sendo a maioria das infecções fúngicas causada por estas leveduras. Espécies de *Candida* são normalmente encontradas no trato gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização vaginal por leveduras do gênero *Candida*. Entretanto, estes microorganismos podem tornar-se patogênicos devido a alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou ao comprometimento de barreiras anatômicas, como consequência de procedimentos médicos invasivos ou queimaduras. As alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas como prematuridade ou envelhecimento, ou ainda consequência de doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, e imunossupressão. Na maioria das vezes, a espécie mais frequentemente envolvida na etiologia das infecções por *Candida* é *C. albicans*. No entanto, nas últimas duas décadas, dados epidemiológicos apontam a emergência de outras espécies de *Candida* não albicans, entre elas, *C. glabrata*.

Historicamente, *C. glabrata* foi considerada como organismo saprófita não patogênico, de microbiota normal em indivíduos saudáveis, raramente causador de infecção em humanos. Contudo, a frequência de infecções sistêmicas e de mucosa

causadas por esta espécie vem crescendo de forma significativa, principalmente em pacientes imunocomprometidos, neonatos e idosos (PRICE et al., 1994; FIDEL et al., 1999; DIEKEMA et al., 2002), fazendo de *C. glabrata* um importante patógeno oportunista e emergente. A emergência de *C. glabrata* como microrganismo patogênico está provavelmente associada ao uso sistemático de terapia imunossupressora concomitante ao uso de antibióticos de amplo espectro, e pelo aumento do número de indivíduos com AIDS (PFALLER et al., 1998; 2001; BADDLEY et al., 2001; RUHNKE, 2006). Um agravante é que uma parcela significativa dos isolados de *C. glabrata* apresenta menor sensibilidade a anfotericina B, e resistência ao antifúngico azólico fluconazol. Desta forma, para alguns autores, o uso prolongado de fluconazol, que constitui medida profilática comum em pacientes com AIDS, em pacientes transplantados, ou após quimio ou radioterapia, pode contribuir para o aumento das infecções por *C. glabrata* (WINGARD et al., 1993, PRICE et al., 1994; PFALLER et al., 1998; 2001; BADDLEY et al., 2001; BODEY et al., 2002; SENDID et al., 2006; PANACKAL et al., 2006).

A seqüência do DNA mitocondrial de *C. glabrata* descrita por Koszul e colaboradores (2003), revelou o menor genoma mitocronial (20 Kb) conhecido dentre as seqüências obtidas para um hemiascomiceto. Conseqüentemente, mutações nos genes ou até mesmo perda total do DNA mitocondrial podem ocorrer em *C. glabrata*, porém sem o comprometimento da viabilidade celular, característica que a define como uma levedura “petite” positiva. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* também é uma “petite” positiva, enquanto que *C. albicans* é considerada “petite” negativa por não sobreviver sem a capacidade de respirar.

O genoma de *C. glabrata*, com 13 cromossomos e 12,3 Mb, foi recentemente seqüenciado pelo programa Genolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), apresentando 38,8% de G+C, o que é bem próximo do encontrado para *S. cerevisiae* (DUJON et al, 2004). De fato, as características do genoma de *C. glabrata* e de vários outros hemiascomicetos indicam que aproximadamente há 100 milhões de anos um ancestral comum das leveduras do grupo *Saccharomyces* (no momento da divergência entre os gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*) sofreu uma duplicação do genoma (“whole genome duplication” ou WGD), seguida de significativa remodelagem no conteúdo gênico conforme as espécies se diferenciavam. Como consequência do WGD, verifica-se que aproximadamente 60% dos genes em *C. glabrata* se encontram em regiões cromossômicas semelhantes às de *S. cerevisiae* (denominadas regiões

“sinténicas” por apresentarem genes homólogos com inclusive a mesma orientação cromossômica conservada), além de ser observado em média cerca de 65% de identidade entre as sequências de aminoácidos das proteínas de *C. glabrata* e *S. cerevisiae* (DUJON et al, 2004; FISCHER et al, 2006; SCANNELL et al, 2006; WOLFE, 2006). Estes resultados e a restrita homologia com *C. albicans* têm levado muitos pesquisadores a propor uma nova denominação para *C. glabrata*: “*Saccharomyces glabrata*”. Entretanto, enquanto as espécies de leveduras do grupo *Saccharomyces* “senso stricto” (p. ex. *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*) aproveitaram a WGD para se tornarem eficientes fermentadores de açúcares, no caso de *C. glabrata* ocorreu significativa perda de genes (aproximadamente 9% menos genes comparado ao total de genes presentes em *S. cerevisiae*), principalmente genes envolvidos na utilização de algumas fontes de carbono, no metabolismo do fósforo, nitrogênio e enxofre, e genes necessários para a biosíntese de vitaminas como tiamina (B1), piridoxina (B6) e niacina. Logicamente que estas perdas gênicas são reflexo da adaptação deste microrganismo ao seu nicho ecológico como patógeno e/ou comensal oportunista em mamíferos, onde não são encontradas fontes de carbono como galactose, sacarose ou maltose, e as vitaminas podem ser facilmente obtidas do hospedeiro (DUJON et al, 2004; HITTINGER et al, 2004; WOLFE, 2006). Portanto, o genoma desta levedura certamente fornecerá importantes informações sobre a biologia, patogenicidade e possíveis alvos terapêuticos deste patógeno oportunista.

I.2 Manifestações clínicas e epidemiologia das Candidíases

Leveduras do grupo *Candida* podem provocar tanto infecções superficiais (geralmente nas mucosas) quanto sistêmicas no ser humano.

I.2.1 Infecções superficiais por *Candida*

As principais infecções de mucosa são as candidíases de orofaringe, esofágica e vaginal. As candidíases de orofaringe (OPC) e esofágica estão comumente relacionadas a diferentes populações de risco, como pacientes com infecção por HIV, com deficiência nutricional, com distúrbios metabólicos (como o diabetes), portadores de neoplasias, de xerostomia (secundária à radioterapia ou por efeitos colaterais da medicação), envelhecimento, Síndrome de Sjogren, e pelo uso de prótese dentária. Em

particular, a candidíase oral ocorre em mais de 90% dos indivíduos portadores do HIV, e estima-se que aproximadamente de 10 a 15% dos pacientes com AIDS irão sofrer também de esofagite por *Candida* durante o progresso da doença.

Predominantemente, o agente etiológico das candidíases orais e esofágicas é a levedura *C. albicans*. E quando cepas de *C. glabrata* são detectadas geralmente estão associadas a infecções por *C. albicans*. Infecções mistas de *C. albicans* com outras espécies de *Candida* são responsáveis pela não resposta ao protocolo terapêutico e pelo agravamento sintomático das OPC, principalmente em indivíduos HIV positivos (CARTLEDGE; MIDGLEY; GAZZARD, 1999). Infecções devidas exclusivamente a *C. glabrata* também têm sido descritas, sendo responsáveis por 14% das OPC em pacientes portadores de HIV (CANUTO et al., 2002). Outro relato aponta *C. glabrata* como causa emergente de OPC em indivíduos portadores de neoplasia de cabeça e pescoço, que se tornam neutropênicos após radioterapia (REDDING et al., 2004). Além disso, *C. glabrata* é descrita como a segunda espécie de *Candida* encontrada na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, principalmente em usuários de próteses dentárias (LYON et al., 2006). E, no Brasil, embora os dados epidemiológicos sejam raros, Melo e colaboradores, em 2004, relatam uma baixa incidência desta espécie em indivíduos portadores de HIV sob terapêutica retroviral. Mesmo assim, a maioria dos isolados de *C. glabrata* apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) para o fluconazol maior que 32 µg/ml.

Candidíase vulvovaginal (VVC) é a infecção mais comum do trato genital. Tem sido estimado que 75% de todas as mulheres terão pelo menos um episódio de vulvovaginite ao longo de suas vidas, caracterizada por quadro sintomático esporádico de severidade média a moderada devido a *C. albicans* e sem nenhum fator de predisposição. Em contraste, cerca de 10% das mulheres sofrem de uma forma complicada da doença com episódios mais severos e recorrentes ou devido a outras espécies de candida não albicans, sendo *C. glabrata* a espécie mais comumente isolada. Em geral, estes pacientes com forma complicada de vaginite por *Candida* têm fatores de predisposição como o diabetes descompensado ou se encontram sob imunossupressão. Não há comprovação de que mulheres infectadas pelo HIV poderiam ter um aumento na taxa de colonização vaginal por espécies de *Candida* não-albicans e assim, maior susceptibilidade a vaginites, diferente do que ocorre nas OPC (SOBEL et al., 1998; GOSWAMI et al., 2000).

Os principais sinais e sintomas de vaginite por *Candida* independentemente da espécie são: prurido, sensação de queimação e leucorréia. Como já mencionado *C. albicans* é a espécie predominante seguida de *C. glabrata* com 14,6% dos isolados (CORSELLO et al., 2003). No Brasil, os poucos relatos epidemiológicos apontam *C. albicans* como espécie presente em 90% dos isolados, seguida de *C. glabrata* com 6% (RIBEIRO et al., 2000). Quanto a susceptibilidade aos antifúngicos azólicos pelas espécies de *Candida* associadas a vulvovaginite, dados indicam que mais da metade dos isolados de *C. glabrata* tiveram susceptibilidade dose dependente, e 15,2% mostraram resistência (MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) ao fluconazol (RICHTER et al., 2005). Desta forma, para mulheres que falham na resposta à terapia com azólicos, o uso de cápsulas vaginais de ácido bórico ou uso tópico de flucitocina são preconizados (SOBEL et al., 2003).

Estudos recentes indicam que a ventilação mecânica por mais de 2 dias predispõe a colonização do trato respiratório por *Candida* em 26,6% dos casos. Geralmente, essa colonização está associada ao tempo prolongado de internação nas UTIs e ao aumento do risco de pneumonia por bactérias, principalmente do genero *Pseudomonas*. E, nestes casos, *C. glabrata* também é a segunda espécie mais freqüentemente encontrada (AZOULAY et al., 2006). Situação semelhante é observada com relação à incidência de *Candida*, e particularmente de *C. glabrata*, nas infecções do trato urinário, que em muitos casos podem provocar complicações sistêmicas e/ou abscessos renais (LUNDSTROM; SOBEL, 2001; OLIVEIRA; MAFFEI; MARTINEZ, 2001).

1.2.2 Forma invasiva ou sistêmica das infecções por *Candida*

São denominadas candidíases invasivas as candidemias, as candidíases disseminadas hematogênicas, e as infecções de órgão(s) por via hematogênica ou por inoculação direta. A candidemia pode difundir a levedura por meio hematogênico para um ou múltiplos órgãos, originando a candidíase disseminada aguda. Acredita-se que a maioria dos casos de candidemias seja adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal. Porém, estas infecções também podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos de profissionais de saúde, de catéteres vasculares em posição central, de implantes, de próteses, bem como pela administração parenteral de soluções. De fato, *C. glabrata* pode ser um importante

agente das infecções nosocomiais, e longos períodos de internação, o uso de antibióticos de largo espectro, a contaminação pelas mãos de enfermeiros e pelo próprio ambiente hospitalar constituem formas de difusão deste microrganismo (VAZQUEZ et al., 1998; VALERIO, WELKERT-OLIVEIRA, RESENDE, 2006).

Os relatos de infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida* eram escassos até a metade do século XX. Nas últimas décadas, *C. albicans* e espécies não-*albicans* vêm se tornando cada vez mais importantes como causa destas infecções. A transformação da levedura, de comensal a importante agente de infecções, ocorreu principalmente em ambiente hospitalar e resulta do próprio progresso da medicina: com o aumento do número de procedimentos invasivos, levando a quebra de barreiras de proteção natural; o uso de antibióticos de amplo espectro; e a capacidade de sustentar a vida de pessoas muito debilitadas e susceptíveis a microorganismos oportunistas (EDWARDS, 1991).

Na década de 1980, o Centro de Controle de Doenças (USA) constatou um aumento de 400% na incidência de candidemia nos principais hospitais americanos. Neste mesmo período, leveduras do gênero *Candida* que representavam o sexto agente mais comum das infecções das unidades de tratamento intensivo, passaram a ocupar a quarta posição, atrás apenas de infecções por *Staphylococcus* e enterococos (EDMOND et al., 1999; RUHNKE, 2006). Observou-se também mudança significativa no que se refere à espécie de *Candida* prevalente nas candidemias. Na década de 80, 75% das candidemias era causada por *C. albicans*, porém, esta proporção caiu para menos de 60% nos anos 90 e, nesta última década, várias fontes apontam uma redução dos episódios de candidoses por *C. albicans* para 30%. No caso das infecções causadas por espécies não *albicans* observou-se um aumento significativo: *C. glabrata*, passou de 2 para 26%, *C. parapsilosis* de 10 para 20%, e *C. tropicalis* de 2 para 24%. Entretanto, variações geográficas importantes no padrão etiológico das infecções invasivas por *Candida* podem ocorrer: nos países da América Latina (incluindo o Brasil) e do Pacífico-Ásia, isolados de *C. glabrata* podem não ser tão frequentes (McMULLAN et al., 2002; COLOMBO et al., 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2004), embora na Irlanda do Norte, *C. glabrata* é a espécie não *albicans* predominante, responsável por 18% das candidemias (McMULLAN et al., 2002). Desta forma, nos EUA e na Europa, *C. glabrata* já é considerada o segundo agente causal de candidemias.

A taxa de mortalidade diretamente atribuída a candidemia é alta, atingindo em média cerca de 44%. Dentre as várias espécies de *Candida*, verifica-se que *C. glabrata*

é a que provoca a mais rápida e letal forma de candidemia em, por exemplo, pacientes com câncer (VISCOLI et al., 1999). Portanto, as infecções por *C. glabrata*, assim como idade avançada, doença em estágio degenerativo, e retenção de catéter intravascular, são considerados fatores de risco independentes para a mortalidade.

I.3 Fatores de virulência para *C. glabrata*

Em *C. albicans* varios fatores de virulência já foram descritos, como a capacidade de secretar hidrolases (proteases e fosfolipases) e a capacidade de formar filamentos (hifas e pseudohifas) (GHANNOUM, 2000; NAGLIK et al., 2004; WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004). Embora algumas destas atividades e/ou propriedades estejam presentes em *C. glabrata*, seu papel na patogenicidade desta levedura é ainda questionável (KAUR et al., 2005). Entretanto, algumas outras características desta levedura importantes para a sua patogenicidade, já foram elucidadas.

A capacidade das leveduras de aderir-se a superfícies abióticas (como cateteres, próteses) assim como umas às outras e também à superfície das células do hospedeiro tem grande relevância médica, uma vez que, esta capacidade propicia a fixação e colonização microbiana. E, o biofilme formado pelas leveduras pode, muitas vezes, beneficiar a seleção de cepas resistentes a drogas (KOJIC; DAROUICHE, 2004). A adesão de espécies de *Candida* a resinas acrílicas de próteses dentárias, por exemplo, é considerado o primeiro passo da patogênese de estomatites. Da análise da colonização de quatro principais resinas constitutivas destas próteses, *C. glabrata* foi a única espécie que foi capaz de aderir a todas as resinas, e a única que se aderiu à resina Vertex (XY et al., 2006).

A adesão das leveduras a superfícies é consequência de moléculas existentes na superfície celular, denominadas adesinas, aglutininas ou floculinas, que geralmente incrementam a hidrofobicidade da superfície celular, permitindo a fixação da levedura a uma variabilidade de substratos (VERSTREPEN; KLIN, 2006). Geralmente os genes que codificam para estas proteínas (genes *FLO* em *Saccharomyces*, genes *ALS* e *EPA* em *C. albicans* ou *C. glabrata*) são formados por famílias gênicas com diversos membros, geralmente situados em regiões teloméricas. Desta forma, estes genes não só estão sujeitos a ampla heterogeneidade no tamanho das proteínas que eles

codificam (permitindo também significativa variação antigênica), mas também a diversos mecanismos regulatórios envolvidos na sua expressão, permitindo a adesão (ou não) do microrganismo, conforme as necessidades e em resposta a estímulos ambientais (VERSTEPEN; REYNOLDS; FINK, 2004; HALME et al., 2004; VERSTEPEN, et al., 2005).

Por exemplo, a expressão da floculina *FLO11* depende não só de cascatas de regulação envolvendo a via de regulação do crescimento filamentosos (via MAPK quinases), como também pela disponibilidade de açúcares que regulam a via proteína quinase AMPc-dependente, e a via de repressão pela glicose. Além destes mecanismos regulatórios, este gene é também regulado por fatores epigenéticos que envolvem a formação de heterocromatina na região telomérica dos cromossomos, atividade regulada pela disponibilidade de NAD^+ e mediada pelo complexo de proteínas *SIR2-4* (RUSCHE; KIRCHMAIER; RINE, 2003; HALME et al., 2004). Em *C. glabrata* encontramos situação semelhante, na medida que, genes *EPA*, responsáveis pela aderência às células do hospedeiro, também são teloméricos e sujeitos a mecanismos regulatórios semelhantes aos encontrados para os genes *FLO* de *S. cerevisiae* (CORMACK; GHORI; FALKOW, 1999; DE LA PENAS et al., 2003; CASTANO et al., 2005). Na verdade, nesta levedura patogênica as características do genoma permitiram descobrir mais um mecanismo regulatório envolvido na expressão de adesinas (e, portanto, um determinante na patogenicidade deste microrganismo): a expressão de alguns genes *EPA*, envolvidos na aderência das leveduras durante infecção do trato urinário, são induzidos pela limitação de ácido nicotínico neste ambiente, um precursor da nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD^+). Portanto, a levedura *C. glabrata* aproveita o auxotrofismo de uma vitamina (o ácido nicotínico) para monitorar ambientes pobres nesta coenzima (p.ex. urina), e sinalizar a expressão de uma adesina específica permitindo a infecção (DOMERGUE et al., 2005).

Os conhecimentos já adquiridos com outras leveduras permitiram também elucidar os mecanismos de resistência (alta) aos antifúngicos apresentada por significativa percentagem de isolados de *C. glabrata*. Os antifúngicos azólicos, sobretudo o fluconazol, têm sido amplamente usados na profilaxia e na terapêutica de candidose em indivíduos imunossuprimidos (receptores de órgãos e medula óssea e pacientes sob quimioterapia) e indivíduos imunocomprometidos (portadores de imunodeficiência e indivíduos com AIDS). *C. glabrata* apresenta uma baixa suscetibilidade intrínseca aos antifúngicos azólicos, o que para alguns autores pode

estar relacionado com o amplo e sistemático uso deste antifúngico em alguns países (PANACKAL et al., 2006; SENDID et al., 2006), embora certamente a exposição ao antifúngico não seja a única causa (KAUR et al., 2005).

Os antifúngicos azólicos agem sobre a via de biosíntese do ergosterol, o principal esteróide da membrana antifúngica. Estes fármacos inibem seletivamente uma enzima do complexo citocromo P450 denominada 14- α -demetilase, bloqueando a demetilação do lanosterol em ergosterol. Ao interferir com a biosíntese do ergosterol, comprometem a permeabilidade da membrana. O mecanismo de resistência aos azólicos foi estudado primeiramente em *C. albicans* (MORSCHHAUSER, 2002). Neste microrganismo, como em *C. glabrata*, a expressão incrementada de transportadores de membrana permite o eficiente efluxo da droga (HITCHCOCK et al, 1993; MIYAZAKI et al, 1998; SANGLARD et al, 2001; VERMITSKY, EDLIND, 2004). Entretanto, a resistência ao azólico pode resultar também do aumento na expressão e conteúdo celular da proteína alvo do antifúngico, a 14- α -demetilase (MIYAZAKI et al, 1998; HENRY, NICKELS, EDLIND, 2000).

Além dos mecanismos já descritos, altos índices de resistência azólica são decorrentes de mutações no DNA mitocondrial que freqüentemente ocorrem nesta espécie, gerando leveduras com deficiência respiratória (DEFONTAINE et al., 1999; BOUCHARA et al., 2000; KAUR, CASTANO, CORMACK, 2004). Alguns autores sugerem que mutantes *petite* sejam selecionados pela terapia com fluconazol. A maior resistência dos mutantes *petite* provavelmente envolve não só um aumento do conteúdo de ergosterol livre (o que também explica sua maior susceptibilidade aos antifúngicos poliênicos), como também maior expressão dos transportadores que permitem o efluxo do composto azólico (BRUN et al, 2004; TSAI et al., 2006).

I.4 Diagnóstico laboratorial das infecções por *C. glabrata*

Normalmente as leveduras são identificadas por uma combinação de critérios morfológicos e fisiológicos (também denominados “bioquímicos”). O aspecto da colônia, as características inerentes à levedura (como tamanho, presença de hifa, pseudo-hifa e/ou de cápsula) e a formação de tubo germinativo e clamidósporo em provas específicas, são alguns dos critérios morfológicos analisados. Os testes bioquímicos, por sua vez, avaliam a capacidade das leveduras de utilizarem

determinados açúcares como fonte de carbono e energia (testes de assimilação e/ou fermentação de carboidratos), e de assimilarem o nitrato como fonte de nitrogênio (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Desta forma, existem no mercado muitos meios de cultivo diferenciais e *kits* que permitem a identificação de leveduras.

Quanto aos aspectos morfológicos, *C. glabrata* forma colônias brancas, lisas, circulares e de bordas bem definidas, que são relativamente indistinguíveis das outras espécies de *Candida*, exceto pelo seu tamanho relativo, que é um pouco menor. Os blastoconídios de *C. glabrata* medem cerca de 1 a 4 µm e, os blastoconídios de *C. albicans* de 4 a 6 µm. Em contraste com outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não apresenta dimorfismo, portanto, não forma pseudo-hifa em temperaturas acima de 37°C, e seu resultado na prova do tubo germinativo é, conseqüentemente, negativo (FIDEL et al., 1999).

O agar cromogênico CHROMagar® (Becton Dickinson), é um meio seletivo e diferencial que permite o isolamento e a identificação (por coloração e morfologia da colônia) de algumas espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER et al., 1996). Colônias de *C. glabrata* neste meio seletivo apresentam cor intermediária entre o róseo e lilás e que, por gerar dúvida (já que, para as demais leveduras não identificadas neste meio a tonalidade esperada é rósea) este não deve ser o único fator para a interpretação final. De forma semelhante, os outros meios cromogênicos comerciais *Candida* ID® (Biomerieux) e *CandiSelect*® (Bio-Rad) são usados para identificação de *C. albicans*, porém não específicos para identificar *C. glabrata*.

Os chamados testes bioquímicos avaliam a capacidade de assimilação de carboidratos por diferentes espécies de leveduras, existindo no mercado vários *kits* comerciais como o API20C® e o ID32C® (BioMérieux), e o Auxacolor® (Bio-Rad). Os resultados se traduzem pelo aparecimento de turvação ou pela viragem de um indicador de pH quando uma suspensão de leveduras é colocada na presença do carboidrato. Já, o teste taxonômico padrão para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras baseia-se na produção de gás carbônico pelas células durante a utilização do carboidrato, e geralmente tubos de Durham invertidos são utilizados para reter o gás formado. Existem também sistemas automatizados como o Vitek® (BioMérieux) e o Microscan Rapid Yeast Indet® (Baxter) onde a incubação e leitura são feitas pelo próprio equipamento (KITCH, et al., 1996; SIDRIM; MOREIRA, 1999). Estes testes bioquímicos clássicos de identificação são laboriosos e demorados (3-7 dias), o

que os tornam, muitas vezes, impraticáveis em laboratórios de rotina. Nessas provas bioquímicas usuais para identificação, uma característica bastante peculiar de *C. glabrata* a diferencia das demais espécies de *Candida*: *C. glabrata* assimila e fermenta apenas dois dos doze açúcares testados: a glicose e o dissacarídeo trealose, formado por duas moléculas de glicose ($\text{Glc}p(\alpha 1 \rightarrow 1)\text{Glc}p$) ligadas através do carbono anomérico (LACAZ et al., 1991). Essa característica é visualizada no anexo A, que apresenta uma tabela comumente encontrada em livros de micologia clínica e é utilizada na identificação das principais leveduras de interesse clínico.

Devido à frequência nos isolados, e à reduzida sensibilidade aos antifúngicos azólicos, um teste diagnóstico rápido que permita a identificação de *C. glabrata* pode ser de suma importância para a decisão terapêutica, especialmente em candidemias sistêmicas. No final dos anos 90, vários testes rápidos foram desenvolvidos prometendo uma rápida e presuntiva identificação de *C. glabrata*. Estes testes baseiam-se na habilidade desta levedura em utilizar eficientemente trealose como fonte de carbono, hidrolisando de forma rápida as moléculas de trealose em duas de glicose. A trealase, enzima responsável pela hidrólise específica da trealose (e não de outros dissacarídeos), é frequentemente encontrada em várias espécies de leveduras, mas em nenhuma dessas outras espécies a hidrólise da trealose é aparentemente tão rápida quanto em *C. glabrata* (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 1999, LOPEZ et al., 2001, FREYDIERE et al., 2002; 2003).

Nestes testes rápidos, uma suspensão de leveduras com grande densidade celular é incubada na presença de trealose, e a glicose gerada pela ação da trealase é então detectada por reagente de cor (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 1999; FREYDIERE et al., 2002). Visando aumentar a especificidade do teste da trealase, agregou-se teste paralelo de hidrólise do dissacarídeo maltose ($\text{Glc}p(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Glc}p$). Enquanto a maioria das outras espécies de *Candida* são eficientes fermentadoras deste açúcar por possuir altos níveis da enzima maltase, *C. glabrata* é incapaz de utilizar a maltose. A sensibilidade atribuída aos testes rápidos da trealase é de 94 a 98%, e sua especificidade pode ser ainda maior, de 95 a 100%, especialmente quando o teste da maltase é realizado em conjunto. Porém, o meio de cultivo utilizado para a obtenção das leveduras pode interferir no desempenho dos testes rápidos, e as primeiras formulações do CHROMagar[®] por exemplo, geravam resultados errôneos no teste rápido, reduzindo sua sensibilidade para 25% (FREYDIERE et al., 2002). Outros trabalhos observaram redução da sensibilidade em até 20% para o teste RAT (rápida

assimilação da trealose) realizado com leveduras isoladas em meio Sabouraud dextrose, e a precisa explicação para esta interferência ainda não é conhecida (MURRAY; ZINCHUK; LARONE, 2005).

Recentemente, numerosas técnicas baseadas no DNA têm sido também desenvolvidas para a identificação de espécies de *Candida*. Em eletroforese em campo elétrico homogêneo (CHEF) o DNA cromossômico de *C. glabrata* pode ser separado em 10 a 13 bandas (VAZQUEZ et al., 1998). Desta forma, várias cepas de *C. glabrata* são identificadas por análise comparativa dos padrões obtidos por CHEF. As técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) e PCR “real time” usadas para a amplificação de DNA alvo de *Candida* são promissoras devido à simplicidade, especificidade e sensibilidade e estão otimizadas para detecção de *Candida* em sangue ou hemocultura, cultura de raspado cutâneo, etc. (CHEN et al., 2000; DASSANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2003; KAMIYA et al., 2005).

Outras estratégias inovadoras que combinam metodologias como o PCR “real time” e sequenciamento por bioluminescência ou pirosequenciamento são capazes de detectar espécies de *Candida* a partir do DNA extraído diretamente do raspado vaginal (TRAMA; MORDECHAI; ADELSON, 2005). Variações intra-específicas de *C. glabrata* podem ser avaliadas através das análises: de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP); de DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD) ou ainda; da seqüência gênica mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade 2 (COX2), e têm sido bastante úteis em estudos epidemiológicos e na investigação de focos de infecções hospitalares (DE MEEUS et al., 2002; BOLDO et al., 2003; ERGON; GULAY, 2005; VALERIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006; WENJIN; JYFU, 2006). Foi através da análise do padrão polimórfico das seqüências de COX2 que pesquisadores brasileiros propuseram a existência de dois “clusters” de cepas de *C. glabrata* associados com suas procedências geográficas, uma dos Estados Unidos e outra do Brasil (SANSON; BRIONES, 2000). Embora promissoras, o emprego dessas técnicas na rotina laboratorial é inviável devido ao alto custo e à necessidade de pessoal qualificado.

No Brasil, na maioria das vezes, o diagnóstico de vulvovaginite por *Candida* é apenas clínico, não havendo remessa de raspado vaginal para análise microbiológica. E, quando feita, a análise laboratorial compreende além da observação microscópica com KOH, provas de formação do tubo germinativo em soro e da produção de clamidósporos em ágar fubá acrescido de Tween 80. Assim, só nos é permitido

discriminar se a levedura é *C. albicans* ou não. A identificação de outras espécies, por necessitarem de provas complementares de assimilação e fermentação de carbono não são realizadas, isto se deve ao fato destas técnicas serem trabalhosas, demoradas e caras. O diagnóstico mais minucioso até a identificação da espécie da levedura, fica restrito a amostras de sangue.

I.5 Metabolização de Trealose por leveduras

A trealose é um dissacarídeo formado pela união de duas moléculas de glicose em uma ligação ($\alpha 1 \rightarrow 1$)-glicosídica. Este dissacarídeo não redutor foi identificado e caracterizado em uma variedade de organismos, como bactérias, fungos, leveduras, plantas e insetos. O interesse biotecnológico da trealose está em suas propriedades como agente protetor ou estabilizante de biomoléculas (vacinas, proteínas, enzimas, membranas), incluindo células inteiras, ou mesmo de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ELBEIN, 1974; THEVELEIN, 1984; COUTINHO et al., 1988; ROSER, 1991; COLAÇO et al., 1992; ELBEIN et al., 2003).

O metabolismo da trealose vem sendo extensivamente estudado na levedura *S. cerevisiae*, onde a trealose é usada como principal carboidrato de reserva, chegando a 20% ou mais de peso seco da célula dependendo das condições de crescimento, de estresse do meio e do estágio do ciclo de vida (SINGER; LINSQUIST, 1998b). Durante períodos de escassez de nutriente, a trealose acumulada pode ser utilizada como fonte de energia. Além disso, a trealose pode também atuar como agente protetor de membrana e proteínas durante situações estressantes, como desidratação, congelamento ou altas concentrações de etanol (HINO et al., 1990; MANSURE et al., 1994; SANO et al., 1999; CERRUTTI et al., 2000). Neste microrganismo, a concentração de trealose celular é controlada pelo balanço entre os processos de biossíntese e hidrólise da trealose.

Em leveduras, a via de síntese da trealose foi elucidada por Cabib e Leloir há mais de 50 anos. A síntese começa com a transferência do resíduo glicosil da uridina-difosfato-glicose (UDP-Glc) para a glicose 6-fosfato (G-6P), resultando em trealose 6-fosfato (T-6P), que é subsequente desfosforilada a trealose. Em *S. cerevisiae*, as enzimas que catalisam estas reações de biossíntese da trealose, a T-6P sintase (Tps1p) e T-6P fosfatase (Tps2p), fazem parte de um complexo com duas outras proteínas

(Tsl1p e Tps3p), que estabilizam a holoenzima. Todas as subunidades do complexo são requeridas para uma atividade ótima, mas a deleção do gene *TPS1* resulta em perda total da atividade de síntese e produção de trealose (BELL et al., 1998). A trealose-6P sintase (*TPS1*) está envolvida também na regulação de uma série de outros processos fisiológicos, incluindo o influxo da glicose na glicólise (THEVELEIN; HOHMANN, 1995). Esta via de síntese é encontrada em várias outras leveduras (GANCEDO; FLORES, 2004), sendo que existem evidências que em *C. albicans*, os genes *TPS1* e *TPS2* são necessários para a patogenicidade da levedura (ZARAGOZA et al., 1998; VAN DIJCK et al., 2002).

1.5.1 Catabolismo da trealose

Existem dois sistemas enzimáticos para o catabolismo da trealose nos fungos, um reversível, envolvendo a fosforilação da trealose pela trealose fosforilase resultando em duas moléculas, uma de glicose e uma α -glicose-1-fosfato, e outro irreversível, através da hidrólise do dissacarídeo por trealases gerando duas moléculas de glicose. A trealose fosforilase tem sido isolada em um número restrito de fungos e leveduras (SCHICK; HALTRICH; KULBE, 1995; EIS et al., 2001; ELBEIN et al., 2003)

Em *S. cerevisiae*, assim como na maioria dos fungos, a hidrólise da trealose envolve basicamente duas trealases (E.C.3.2.1.28), denominadas de trealase ácida e trealase neutra. Estas enzimas apresentam várias diferenças no que se refere à localização, propriedades catalíticas e regulação. A trealase neutra (Nth1p) é citoplasmática e exibe atividade máxima em pH neutro (pH 6,7 a 7,0), sendo ativada por Ca^{2+} e Mn^{2+} e regulada por mecanismo de fosforilação que envolve a proteína quinase cAMP-dependente, convertendo a enzima para sua forma ativa fosforilada (THEVELEIN, 1988). O gene que codifica a trealase neutra foi clonado e seqüenciado em alguns fungos como *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* (D'ENFERT et al., 1999), nas leveduras *S. cerevisiae* (KOPP; MÜLLER; HOLZER, 1993), *Schizosaccharomyces pombe* (SOTO et al., 1998), *Kluyveromyces lactis* (AMARAL et al., 1997), e *C. albicans* (ECK et al., 1997), Mais recentemente, o gene desta enzima foi caracterizado no fitopatógeno *Magnaporthe grisea* (FOSTER; JENKINSON; TALBOT, 2003), e no patógeno de insetos *Metarhizium anisopliae* (XIA; CLARKSON; CHARNLEY, 2002; XIA et al., 2002; SMALL; DONALDSON; BIDOCHKA, 2004).

Comparativamente, o gene da trealase ácida foi clonado apenas na levedura *S. cerevisiae* (DESTRUELLE et al., 1995) e no fungo filamentoso *A. nidulans* (D'ENFERT;

FONTAINE, 1997). A trealase ácida é ativa como monômero nas leveduras e aparentemente como um dímero em *A. nidulans*. É considerada altamente específica para a trealose, tendo K_m entre 0,2 a 5 mM, e seu pH ótimo de atividade está entre o pH 4,5 a 5,0 (LONDESBOROUGH; VARIMO, 1984; JORGE et al., 1997; AQUINO et al., 2005). Além dessas características este tipo de trealase parece não ser regulada por mecanismos pós-transcricionais, e na análise de suas seqüências protéicas um alto número de possíveis sítios de N-glicosilações e a presença de peptídeo sinal ou transmembrana podem ser observados (MITTENBUHLER; HOLZER, 1988; 1991). Em *S. cerevisiae*, esta enzima está localizada nos vacúolos e sua atividade é independente de cátions bivalentes (DESTRUELLE et al., 1995). Enquanto a trealase neutra hidrolisa a reserva de trealose intracelular (KOPP et al., 1993), a trealase ácida seria necessária para o crescimento da levedura utilizando trealose como fonte de carbono (NWAKA et al., 1996; NWAKA; HOLZER, 1998).

Estas enzimas exibem também um padrão de atividade oposto ao longo do ciclo de crescimento. A atividade da trealase citossólica é mais alta durante crescimento exponencial com açúcares fermentáveis (glicose, manose ou galactose), com uma queda na atividade à medida que as células entram na fase estacionária, coincidindo com o início da biosíntese da trealose. Já, no caso da trealase ácida, sua principal atividade é detectada durante a fase estacionária ou em culturas que cresceram com substratos respiráveis (glicerol e etanol), indicando que esta enzima é sujeita a repressão catabólica pela glicose (SAN MIGUEL; ARGUELLES, 1994).

Como já mencionado, a trealose pode ser usada como fonte de carbono para o crescimento de fungos e leveduras. As células de *S. cerevisiae* possuem um transportador ativo para trealose na membrana plasmática (STAMBUK et al., 1996; 1998; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001), codificado pelo gene *AGT1*, também necessário para o crescimento em trealose (MALLUTA et al., 2000) Entretanto, para que a hidrólise da trealose extracelular pudesse acontecer dentro dos vacúolos (NWAKA et al., 1996; NWAKA; HOLZER, 1998), seria imprescindível que a trealose atravessasse a membrana vacuolar, e as moléculas de glicose produzidas teriam que sair do vacúolo para serem metabolizadas pela célula. Independentemente do mecanismo molecular envolvido, a utilização de trealose por esta levedura ocorre através do metabolismo aeróbico (quer dizer, o açúcar não é fermentado até etanol e CO_2), provavelmente causado pelo lento influxo de moléculas de açúcar para a via glicolítica (MALLUTA et al., 2000).

Em contraste, em fungos filamentosos como *A. nidulans* (D'ENFERT; FONTAINE, 1997) e *N. crassa* (HECKER; SUSSMAN, 1973) e nos zigomicetos termotolerantes *Mucor rouxii* (ALMEIDA et al., 1997; LUCIO et al., 2000) e *Rhizopus microsporus* (AQUINO et al., 2005), a utilização de trealose envolve outra via, onde o açúcar é hidrolisado extracelularmente por uma trealase ácida e a seguir as moléculas de glicose geradas são metabolizadas pelas células. Nestes organismos e em outros fungos, a atividade trealase extracelular se encontra ligada à parede celular dos ascósporos e conidiósporos, no espaço periplásmico (HECKER; SUSSMAN, 1973, D'ENFERT; FONTAINE, 1997; LUCIO et al., 2000) ou, no meio de cultura (WILLIAMS; NIEDERPRUEM, 1968; THEVELEIN, 1984; KADOWAKI et al., 1996; DEKKER et al., 1997; WISSER et al., 2000; AQUINO et al., 2005). A trealase ácida presente nos conidiósporos de *A. nidulans* foi purificada, e seu gene (*treA*) clonado. O gene *treA* apresenta grande homologia com o gene *ATH1* da trealase ácida vacuolar de *S. cerevisiae* e, da mesma forma, mostrou-se ser essencial para o crescimento em trealose já que mutantes que sofreram substituição no locus deste gene se tornavam incapazes de crescer em trealose (D'ENFERT; FONTAINE, 1997).

Pouco é conhecido sobre os mecanismos de utilização de trealose em outras leveduras. Em *C. albicans*, por exemplo, foi sugerido que a trealase ácida esteja associada à superfície externa (RAM et al., 1984; ALVAREZ-PERAL; ARGUELLES, 2000). A presença de trealases ácidas extracelulares já foi descrita também em *Phycomyces blakesleeanus* e *Rhodotorula rubra* (MANSURE; SILVA; PANEK, 1992; LOPEZ-GALLARDO et al., 1995). Já, em *C. utilis*, não há evidência de atividade trealase extracelular ou ligada à parede, e foi reportado ainda que algumas linhagens de *C. utilis* sem atividade trealase ácida são capazes de crescer em trealose. Numa outra linhagem desta levedura o crescimento em trealose depende da atividade de um transportador de trealose e de trealases ácidas e neutras intracelulares, sendo que estas atividades são reguladas pela fonte de carbono, sendo induzidas na presença de trealose ou maltose e reprimidas na presença de glicose ou glicerol (ARGUELLES; GACTO, 1985; ROY; GHOSH, 1998; ROY et al., 2001; ROLIM et al., 2003).

II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A utilização de trealose por *C. glabrata* constitui a base para sua identificação, principalmente nos testes rápidos recentemente introduzidos na prática laboratorial. Entretanto, pouco é conhecido a respeito da metabolização de trealose por esta levedura patogênica. Existe apenas um único trabalho descrevendo o gene *SNF1* como necessário para a utilização deste açúcar como fonte de carbono por *C. glabrata* (PETTER, KWON-CHUNG, 1996). O gene *SNF1* em *S. cerevisiae* controla o mecanismo de repressão/desrepressão pela glicose e foi descoberto pela incapacidade de mutantes neste gene fermentarem a sacarose (CELENZA, CARLSON, 1986). O gene *SNF1* de *C. glabrata* apresenta maior homologia com o gene de *S. cerevisiae* do que com o gene correspondente em *C. albicans* (PETTER, KWON-CHUNG, 1996). Dada a importância da metabolização de trealose em leveduras e, em particular em *C. glabrata*, por constituir a base para sua identificação laboratorial, pretendemos:

- Caracterizar o tipo de metabolismo (aeróbico ou fermentativo) realizado por *C. glabrata* para utilizar trealose como fonte de carbono. Com este objetivo, pretendemos avaliar os parâmetros de crescimento, como biomassa formada, consumo dos açúcares, produção de etanol, etc.
- Caracterizar bioquimicamente a trealase de *C. glabrata* que é utilizada para o crescimento em trealose. Serão avaliados a especificidade, afinidade pelo substrato, pH ótimo e massa molecular aparente da enzima.
- Analisar os mecanismos regulatórios envolvidos na expressão da atividade trealase nas células.
- Analisar *in silico* possíveis genes necessários para a utilização de trealose por *C. glabrata*, incluindo sua clonagem e/ou interrupção do genoma, e analisar as consequências fenóticas produzidas nas leveduras modificadas.

III MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Cepas utilizadas

As cepas de leveduras usadas no presente trabalho estão relacionadas na Tabela 1. As cepas de *C. glabrata* LEMI 6099 a LEMI 8228 fazem parte da coleção do Laboratório Especial de Micologia Médica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo. Todas estas cepas foram isoladas a partir das indicadas amostras biológicas (vide Tabela 1) no Hospital São Paulo, com exceção do isolado LEMI 7186A obtido no Hospital do Rim e Hipertensão. A cepa 72 nos foi doada pela Profa. Dra. Nancy Porto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). A cepa Bg2 e Bg14 foram gentilmente cedidas do Prof. Dr. Brendan P. Cormack do Departamento de Biologia Molecular e Genética da Faculdade de Medicina Johns Hopkins, em Baltimore (USA).

Tabela III.1 Cepas de levedura estudadas

Espécie e cepa	Característica e/ou genótipo
<u><i>C. glabrata</i></u>	
LEMI 6099	Isolado clínico (fezes)
LEMI 6469A	Isolado clínico (urina)
LEMI 6947	Isolado clínico (secreção traqueal)
LEMI 7186A	Isolado clínico (lavado bronco-alveolar)
LEMI 8228	Isolado clínico (urina)
72	Isolado clínico
Bg2	Isolado clínico (vagina)
Bg14	Cepa Bg2, mas <i>ura3Δ::Tn903 Neo^R</i>
<u><i>C. albicans</i></u>	
3153	Isolado clínico
<u><i>S. cerevisiae</i></u>	
CEN.PK2-1C	<i>MATα ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289 MAL 2-8^c SUC2</i>

A cepa de *C. albicans* 3153 foi cedida pelo Prof. Dr. Jairo Santos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e obtida do London School of Hygiene & Tropical Medicine (UK). Finalmente, a cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C foi cedida pela Dra. Angélica. F. Maris, e obtida da EUROSCARF (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis), Frankfurt, Alemanha.

III.2 Meios e condições de cultivo

As células de levedura foram crescidas em meio rico YP contendo 1% de extrato levedura (Sigma) e 2% de bacto-peptona (Difco), suplementado com 2% de trealose (Sigma), glicose (Casa da Química ou Sigma), ou 2% etanol/ 3% glicerol, ou 3% (v/v) glicerol. Alternativamente, as cepas foram crescidas em meio mínimo YNB contendo 0,7% base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (Sigma), 2% da fonte de carbono e suplementados com 22 mg/L uracila quando requerido. Os meios ricos tiveram o pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico, e o meio mínimo foi tamponado com 50 mM succinato-Tris, pH 5,0. Foi adicionado 2% bacto-agar (Sigma) aos meios sólidos, e os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. Quando indicado, foi adicionado 5 µg/ml de antimicina A (Sigma, solução estoque 5 mg/ml em etanol) ou até 800 µg/ml de geneticina (G-418, Gibco) aos meios após a esterilização. O meio de crescimento líquido não ocupou mais que 1/5 do volume total do frasco para garantir aeração adequada, e as culturas foram mantidas a 28°C sob agitação orbital (160 rpm). O crescimento celular foi determinado pela leitura da densidade óptica das culturas a 570 nm.

III.3 Determinação de glicose, trealose e etanol

Amostras das culturas foram centrifugadas a 2.600 g por 1 min, e os sobrenadantes usados para a determinação de trealose, glicose e produção de etanol. A concentração de glicose foi determinada enzimaticamente utilizando-se glicose oxidase e peroxidase através de um kit enzimático comercial (Bio Técnica, Brasil)

seguinto as instruções do fabricante. A concentração de etanol foi determinada enzimaticamente com álcool oxidase (de *P. pastoris*, Sigma) e peroxidase (de raiz-forte, Toyobo do Brasil), conforme descrito por Salgado e colaboradores (2000) e Rodinov e colaboradores (2002). A trealose foi dosada enzimaticamente com 0,17 U/ml de trealase de rim de porco (Sigma) em tampão 100 mM succinato-Tris, pH 5,5, a 37°C por 4h, sendo a glicose liberada pela ação da trealase determinada como descrito acima.

III.4 Determinação da atividade trealase

A atividade trealase foi determinada nas células íntegras através da adaptação de um método para dosar atividade invertase extracelular em *S. cerevisiae* (SILVEIRA et al., 1996). As células (aproximadamente 10 mg), previamente centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas duas vezes com água gelada, eram ressuspensas em 1 ml de tampão 50 mM acetato de sódio (pH 5,0) contendo 50 mM fluoreto de sódio, e incubadas por 30 min a 30°C. A seguir 50 µl desta suspensão celular foi adicionada a 50 µl de tampão 100 mM succinato-Tris (pH 4,4), e a reação enzimática iniciada pela adição de 100 µl de 200 mM trealose. Após incubação por 10 min a 30°C, a reação foi interrompida através de fervura das amostras por 5 min. Para a dosagem da atividade enzimática nos sobrenadantes de cultura (previamente filtrados em membrana Millipore® com poro de 0,22 µm), ou frações obtidas durante a purificação da enzima, as células foram substituídas por 50 µl das amostras em análise, e em alguns casos as reações extendidas até 30 min a 30°C. Após fervura as amostras foram centrifugadas, e 10 µl do sobrenadante usados para determinar a concentração de glicose liberada como descrito acima. As reações foram realizadas em triplicata, e controles contendo amostras previamente fervidas foram sempre utilizados. Somente foram aceitos valores com menos de 10% de variação entre as triplicatas. A atividade enzimática foi expressa em unidades (U), onde uma unidade é a quantidade de enzima que produz 1 µmol de glicose min⁻¹ nas condições do ensaio (30°C e pH 4,4).

III.5 Dosagem de proteínas

A concentração protéica das amostras foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (Sigma) como padrão.

III.6 Técnicas de purificação de proteínas

III.6.1 Preparação das amostras

A enzima foi obtida do sobrenadante de cultura de células de *C. glabrata* crescidas em meio rico YP contendo 3% glicerol, obtido após centrifugação (3000 g, 5 min), e filtração em membrana Millipore® (0,22 µm). Os sobrenadantes foram congelados (-20°C), liofilizados (liofilizador Pirani 78/1, Edwards do Brasil), ressuspensos no menor volume de água destilada, e dialisados em sacos de diálise (permeáveis para peptídeos de até 3,5 kDa) por 12 horas sob refrigeração em tampão 10 mM fosfato de sódio, pH 7,4. Após a diálise, as amostras foram concentradas em microconcentradores Amicon® Centricon® YM 50 (Millipore) por centrifugação, a 4°C e 5000 g (centrífuga Hitachi modelo CP 30mX) pelo tempo necessário até a obtenção de um volume de amostra próximo a 500 µl. A seguir as amostras foram acrescidas de 10% glicerol e mantidas congeladas a -20°C.

III.6.2 Filtração em gel

Para a filtração em gel foi usada uma coluna Superdex S-200 30/100GL (Amersham) com volume de 24 ml, acoplada a um sistema de cromatografia de alta resolução AKTAFLPC™ (Amersham). A coluna foi previamente equilibrada com tampão 100 mM succinato-Tris (pH 4,4) contendo 10% glicerol. Após aplicar 100 µl da amostra, a cromatografia foi realizada com o mesmo tampão sob um fluxo de 0,75 ml/min, sendo coletadas frações de 300 µl. As leituras espectrofotométricas das frações eluídas da coluna foram realizadas a 280 nm. A coluna foi calibrada com padrões de peso molecular (Sigma MW/GF1000) contendo anidrase carbônica bovina (29 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), amilase (200 kDa), anfotericina de baço de cavalo (443 kDa), e tiroglubulina bovina (669 kDa).

III.6.3 Coluna de afinidade com lectina

A resina de Sepharose 4B com a lectina Concanavalina A ligada (Amersham) foi inicialmente equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 0,5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, e 1 mM MgCl₂. As amostras com atividade enzimática foram incubadas em batelada (ou em colunas de aproximadamente 1 ml) com a resina por 3 horas, a temperatura ambiente, sob agitação moderada. Em seguida a resina foi lavada com 3-5 volumes do mesmo tampão, e a eluição realizada com tampão 100 mM succinato-Tris (pH 4.6), contendo 0,5 M α -metil-D-manosídeo e 0,5 M α -metil-D-glicosídeo. Alternativamente, foi testado também o tampão 0,1 M borato de sódio (pH 6,5), as adições de 0,6 M NaCl, 1% Triton X-100, 20% etanol, 1 M manose, 1 mM CaCl₂ mais 1 mM MnCl₂ e 1 mM MgCl₂, ou as várias combinações possíveis destes compostos e/ou tampões.

III.7 Eletroforese de proteínas

As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo na presença de detergente (SDS-PAGE) seguindo metodologias padrões (AUSUBEL et al., 1995). A concentração poliacrilamida-bisacrilamida (30:1) do gel de empilhamento foi 3%, e do gel de separação 7,5%. As amostras foram dissolvidas em tampão 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), contendo 4% SDS e 30% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 4% β -mercaptoetanol, e a corrida foi realizada a 75 V utilizando-se tampão 25 mM Tris-glicina (pH 8,6) contendo 0,1% SDS até a migração total do azul de bromofenol. Após a corrida, o gel foi corado com prata usando-se dois protocolos distintos, o de Blum, Beier e Gross (1987), ou o do Kit "ProteoSilverTM" da Sigma. Os padrões de peso molecular usados foram o SDS-6H (Sigma) contendo miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa), ou então o M403 (Sigma) contendo miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamina desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa). Quando requerido, as amostras foram precipitadas com 10% ácido tricloroacético (MERCK) a 4°C por 20 min, centrifugadas (12000 g, 10 min), e lavadas com acetona para remoção

do ácido. O precipitado foi então ressuspensão em tampão de amostra e analisado por SDS-PAGE como descrito acima.

III.8 Técnicas de Biologia Molecular

Com o intuito de excluir um gene de interesse em *C. glabrata* foi utilizada a técnica de recombinação homóloga com regiões flangeadoras longas (PERSON; HERNANDO; SCHWEIZER, 1998; CORMACK; FALKOW, 1999), utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela III.2. Com estes oligonucleotídeos foram gerados, por PCR, dois fragmentos de DNA independentes de 447 e 380 pb (vide Resultados a seguir) que foram a seguir utilizados para amplificar, também por PCR, o gene *URA3* presente no plasmídeo pAG60 (GOLDSTEIN; PAN; McCUSKER, 1999), ou o gene *kan^R* presente no plasmídeo pFA6a-kanMX6 (LONGTINE et al., 1998). As reações de PCR para obter os fragmentos de DNA foram realizadas com 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), num volume final de 50 µl, contendo 1,0 µl de dNTP 10mM; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5,0 µl de tampão 10x concentrado da Taq DNA polimerase; 1 µl de cada iniciador *P1-P2* ou *P3-P4* (200 pmol/µl), e uma colônia de levedura como fonte do DNA. Para as reações foi usado o seguinte protocolo: 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de [a) 2 minutos a 92°C; b) 45 segundos a 45°C; e c) 1 minuto a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C. Para amplificar o gene *URA3* ou *kan^R* foram utilizados 1,0 µl dos iniciadores externos *P1* e *P4* (200 pmol/µl), 1,0 µl dos produtos de cada reação anterior contendo os fragmentos de DNA de 447 e 380 pb, e 1,0 µl do plasmídeo pAG60 ou pFA6a-kanMX6, sendo que neste caso as condições do PCR foram: 5 ciclos de [a) 10 segundos a 94°C; b) 30 segundos a 40°C; c) 4 minutos a 72°C], e 25 ciclos de [a) 10 segundos a 94°C; b) 30 segundos a 55°C; c) 4 minutos a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C.

Aos produtos de PCR foi adicionado tampão de amostra 2 vezes concentrado composto por 20% (p/v) Ficoll 400, 0,1 M EDTA, 1,6% SDS e 0,05% de azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em Tampão 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8, contendo 2,5 µg de brometo de etídio/ml a 100 V em tampão 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8, até a migração total do azul de bromofenol. Após a corrida, as bandas de DNA no gel foram visualizadas sob luz UV, e

as bandas de interesses recortadas e purificadas do gel através do kit Concert DNA Purification System (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Estes fragmentos de DNA lineares foram utilizados para transformar a cepa LEMI 8228 ou Bg14 (*ura3Δ*) de *C. glabrata* através da técnica do acetato de lítio (KNOP *et al.*, 1999), e as células transformadas selecionadas em placas de meio rico YP contendo 2% glicose e até 800 µg/ml de geneticina ou, alternativamente, em placas de meio sintético YNB sem uracila contendo 2% glicose ou 3% glicerol como fonte de carbono.

Tabela III.2 Oligonucleotídeos utilizados

Iniciador	Seqüência ^a (5'→3')
<i>P1</i>	TTGTATGCGGGGGGTGTACC
<i>P2</i>	GCGTACGAAGCTTCAGCTGG TGTACTCCTCTTTCCAGACC
<i>P3</i>	GATCCACTAGTGGCCTATGCATCGGC ATCGATGATGACATTATTAA
<i>P4</i>	CGAATACTTCTCAACTATCC

^aAs seqüências são complementares às regiões acima e após o gene *CAGL0K05137g* de *C. glabrata* (vide <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), com exceção das seqüências em itálico e negrito que são complementares ao plasmídeo pAG60 e pFA6a-kanMX6 (LONGTINE *et al.*, 1998; GOLDSTEIN; PAN; McCUSKER, 1999).

IV RESULTADOS

Como descrito na Introdução, o catabolismo da trealose pela levedura *S. cerevisiae* é completamente oxidativo, isto é, esta levedura não fermenta esta fonte de carbono. Conseqüentemente o crescimento em trealose é inibido quando antimicina A, um bloqueador do citocromo bc1 (complexo III) da cadeia respiratória, é adicionado ao meio de cultura (MALLUTA et al., 2000). Considerando a semelhança entre *S. cerevisiae* e *C. glabrata*, inicialmente foi testado se a antimicina A seria capaz de inibir o crescimento desta levedura em meios contendo trealose como fonte de carbono. Uma cepa de *C. albicans* foi também incluída na nossa análise para efeitos comparativos. Na Figura IV.1, notamos que todas as cepas de levedura foram capazes de crescer em meios contendo trealose como fonte de carbono, na ausência de antimicina A. Entretanto, a presença deste inibidor impediu o crescimento de *S. cerevisiae*, e em menor grau, de *C. albicans* em trealose. Por outro lado, todas as cepas de *C. glabrata* analisadas mostraram crescimento em trealose, mesmo na presença de antimicina A.

O resultado mostrado na Figura IV.1 sugere que *C. glabrata* seja capaz de obter energia a partir de trealose, fermentando esta fonte de carbono, o mesmo não foi observado com as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*. A seguir, foi analisado se *C. glabrata* poderia, de fato, fermentar a trealose (produzindo etanol), e o perfil fermentativo em trealose foi comparado ao de células crescidas em glicose (uma fonte de carbono tipicamente fermentada). Novamente, a linhagem de *C. albicans* foi incluída para efeitos comparativos. A Figura IV.2 mostra que tanto *C. glabrata*, quanto *C. albicans*, crescem exponencialmente (Fig. IV.2A), produzindo significativas quantidades de etanol (Fig. IV.2B) ao consumir a glicose presente no meio (Fig. IV.2A) e atingindo, praticamente, as mesmas densidades celulares ao final do crescimento (Fig. IV.2A).

Porém, um perfil metabólico distinto foi observado quando o crescimento dessas leveduras foi analisado em meio de cultivo contendo trealose como fonte de carbono (Figura IV.3). *C. albicans* cresceu pouco nesta fonte de carbono (Fig. IV.3A), consumindo apenas 10% do dissacarídeo presente no meio de cultivo (Fig. IV.3A). Ao contrário disso, *C. glabrata* apresentou um crescimento vigoroso em trealose, consumindo totalmente o açúcar do meio nas primeiras 10 horas (Fig. IV.3A), o que coincidiu com o final da sua fase logarítmica de crescimento.

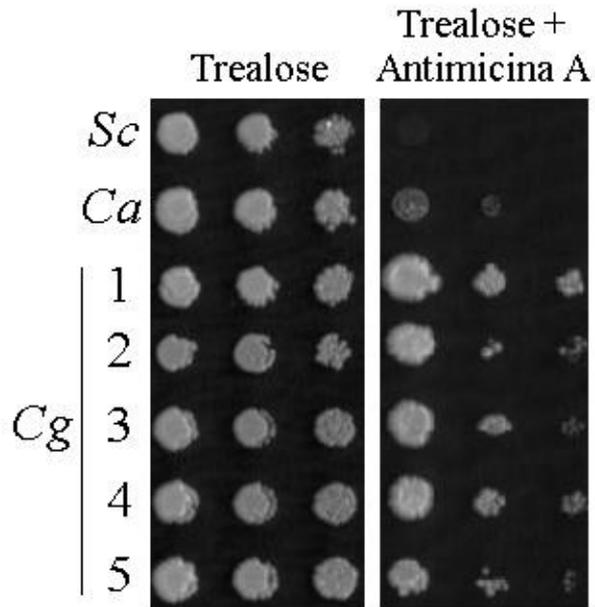


Figura IV.1. Efeito da Antimicina A no crescimento de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. glabrata* em trealose. Diluições seriadas (1:10) de uma suspensão de leveduras (concentração inicial de 0,5 mg de células/mL) foram inoculadas com o auxílio de um replicador, em meios de cultura ricos YP sólidos contendo 2% trealose, na ausência ou presença de 5 ug/mL de antimicina A, e incubadas a 28°C, por 2 dias. Na Figura IV. estão mostradas as cepas CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae* (**Sc**), 3153 de *C. albicans* (**Ca**), e as cepas LEMI 6099 (N° 1), LEMI 6469A (N° 2), LEMI 6947 (N° 3), LEMI 7186A (N° 4) e LEMI 8228 (N° 5) de *C. glabrata* (**Cg**).

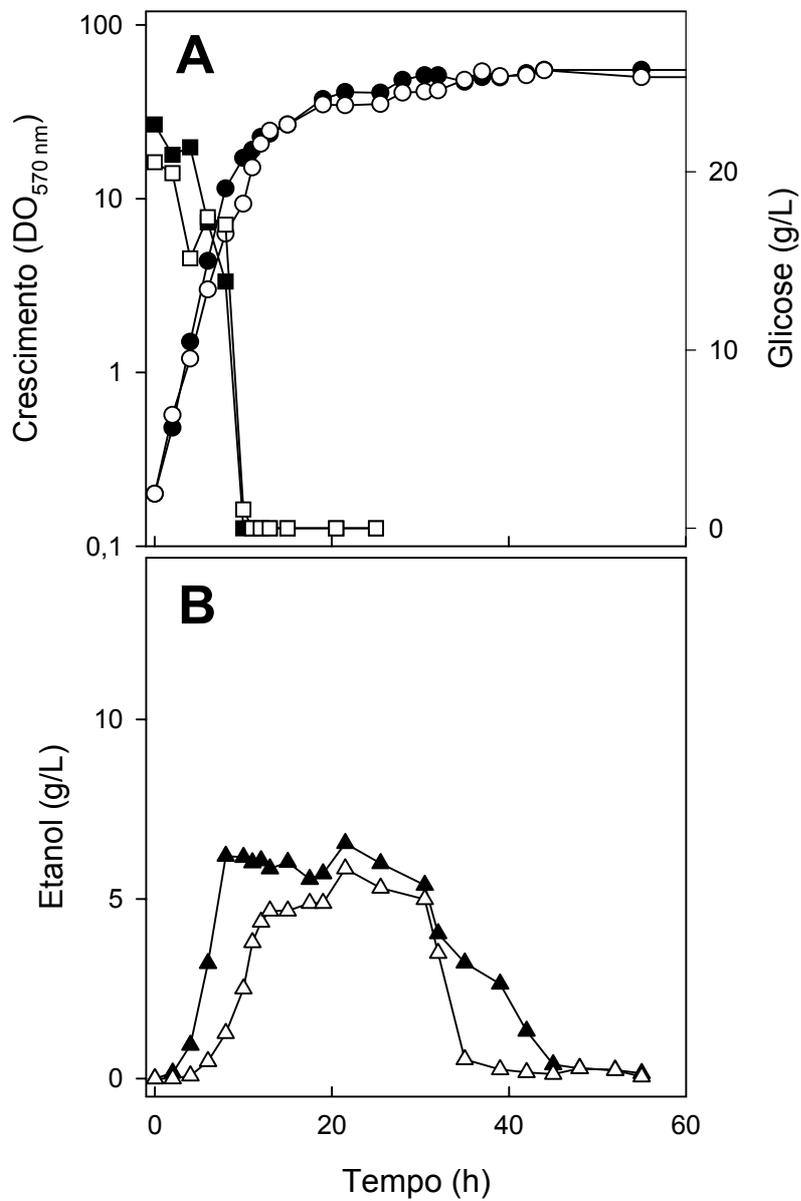


Figura IV.2. Crescimento de *C. glabrata* e *C. albicans* em glicose. O crescimento celular (●, ○) e consumo (■, □) da glicose (painel **A**), bem como a produção de etanol (▲, △, painel **B**), foram determinados em meio rico YP contendo 2% de glicose e inoculados com as cepas 72 de *C. glabrata* (símbolos fechados) ou 3153 de *C. albicans* (símbolos abertos) como descrito em Materiais e Métodos.

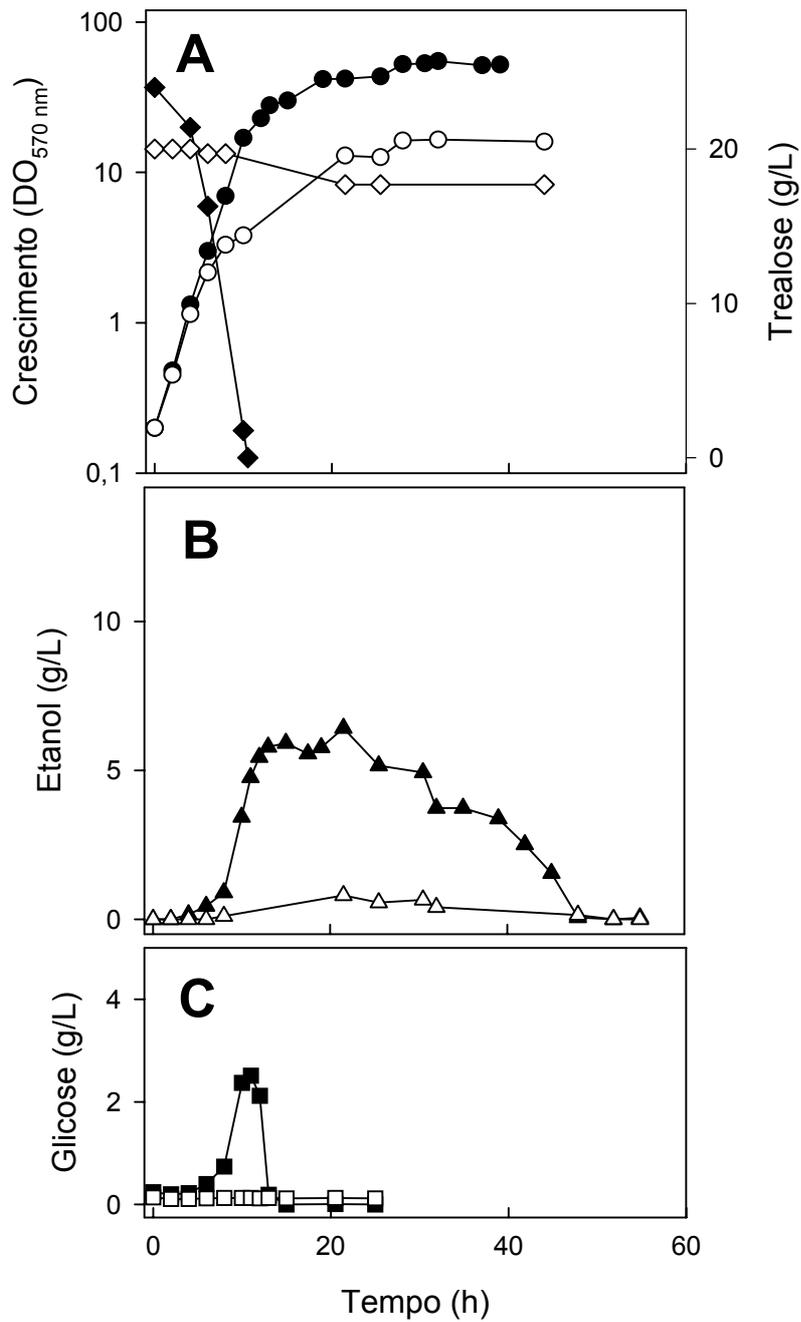


Figura IV.3. Crescimento de *C. glabrata* e *C. albicans* em trealose. O crescimento (●,○) e consumo da trealose (◆,◇, painel **A**), a produção de etanol (▲, △, painel **B**) e produção de glicose (■,□, painel **C**), foram determinados em meio rico YP contendo 2% de trealose e inoculados com as cepas 72 de *C. glabrata* (símbolos fechados) ou 3153 de *C. albicans* (símbolos abertos) como descrito em Materiais e Métodos.

O consumo da trealose por *C. glabrata* levou também à significativa produção de 6,5 g/L de etanol, enquanto que, *C. albicans* mostrou-se incapaz de fermentar a trealose, como seria eventualmente esperado, devido ao baixo consumo do açúcar por esta levedura (Fig. IV.3B). Os motivos que provocaram a incapacidade de *C. albicans* de consumir toda a trealose do meio são atualmente desconhecidos, mas é importante salientar que, embora o meio de cultivo rico YP apresentasse um pH inicial ácido (pH ~5,0), ao final do crescimento da cepa de *C. albicans* em trealose, o pH do meio se tornou fortemente alcalinizado (pH >7,5, vide a Discussão).

Um outro resultado que merece destaque é o aparecimento de um pico transitório de glicose (atingindo 2,5 g/L) durante a assimilação de trealose por células de *C. glabrata* (Fig. IV.3C). Enquanto que, ao longo do crescimento de *C. albicans*, nesta mesma fonte de carbono, não foi detectada glicose no meio. De fato, ao analisarmos as cinéticas de consumo e fermentação de glicose e trealose por *C. glabrata* (vide Fig. IV.2 e IV.3), notamos que esta levedura apresentou praticamente o mesmo perfil fermentativo com qualquer um dos açúcares. Sugerindo que a trealose esteja sendo hidrolisada extracelularmente e que, na verdade, seriam as moléculas de glicose produzidas a partir da trealose, a fonte de carbono usada por *C. glabrata* para crescer.

Para melhor caracterizar o perfil de utilização dos açúcares por *C. glabrata*, foi analisado o crescimento desta levedura também em meio mínimo sintético YNB, contendo 2% glicose ou trealose como fonte de carbono. Como pode ser observado na Figura IV.4, as células de *C. glabrata* cresceram rapidamente no meio com glicose, sendo o açúcar totalmente consumido já nas primeiras 25 horas (Fig. IV.4A), produzindo 3,5 g/L de etanol. O etanol, por sua vez, após 50 horas de crescimento passou a ser consumido com a mudança do metabolismo fermentativo para respiratório (Fig. IV.4B). Quando a fonte de carbono era trealose (Figura IV.5), observamos uma fase *lag* maior, as células levaram quase 25 horas para começar a crescer (Fig. IV.5A). Entretanto, foi produzida mais biomassa e menos etanol (2,6 g/L, Fig. IV.5B) do que durante o crescimento em glicose. O pico transitório de glicose observado em meio rico YP com 2% de trealose (vide Fig. IV.3C) também foi observado no meio mínimo YNB com trealose, porém numa concentração menor (~0,5 g/L, Fig. IV.5C).

Portanto, os resultados indicam que quando *C. glabrata* está utilizando trealose, as células encontram-se menos reprimidas pelo açúcar, e conseqüentemente, mais carbono é direcionado à produção de biomassa, ocorrendo uma menor produção

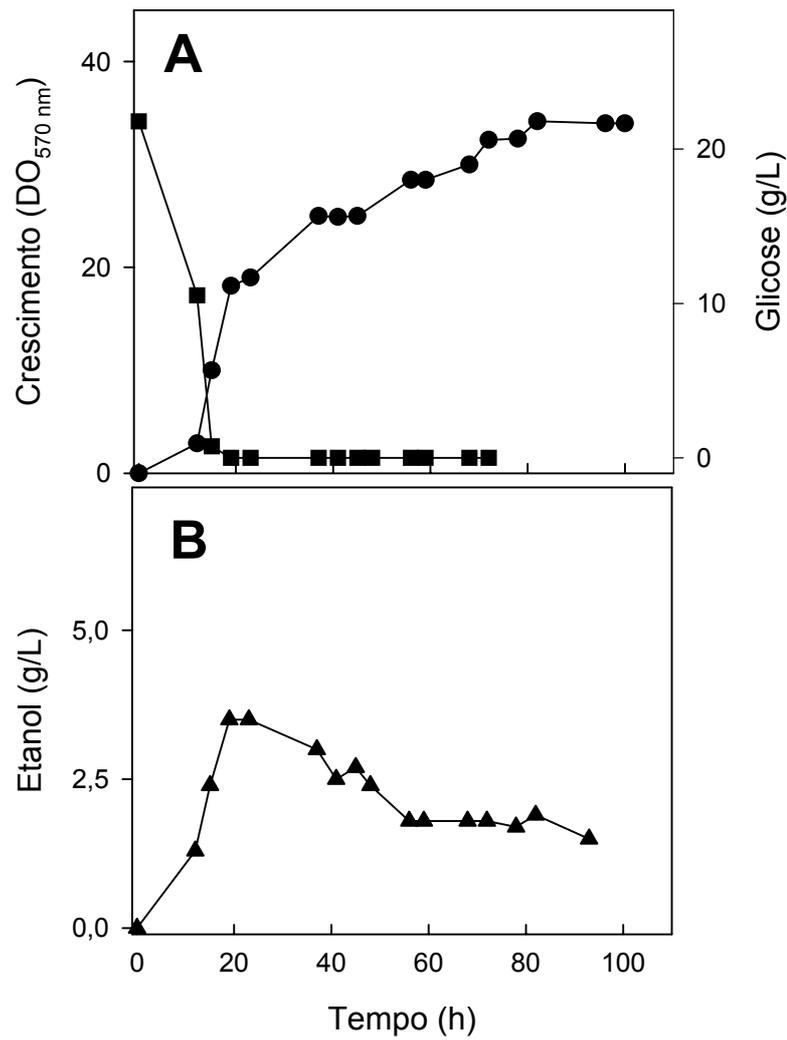


Figura IV.4. Crescimento de *C. glabrata* em meio mínimo com glicose. O crescimento celular (●) e consumo (■) da glicose (painel A), bem como a produção de etanol (▲, painel B), foram determinados em meio mínimo sintético YNB contendo 2% de glicose, inoculados com a cepa 72 de *C. glabrata*, como descrito em Materiais e Métodos.

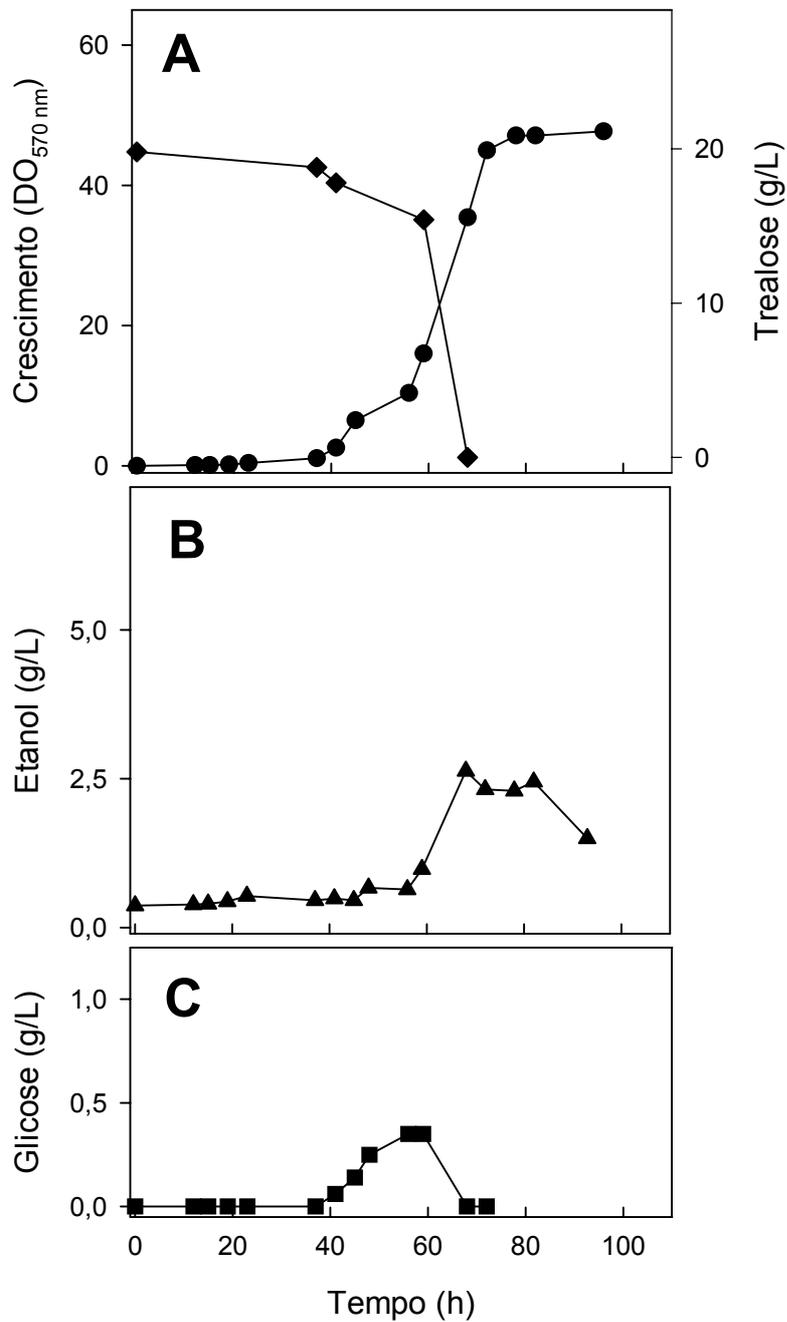


Figura IV.5. Crescimento de *C. glabrata* em meio mínimo com trealose. O crescimento (-●-) e consumo (◆) da trealose (painel **A**), a produção de etanol (painel **B**) e de glicose (painel **C**) no sobrenadante de cultura, foram determinados em meio mínimo sintético YNB contendo 2% de trealose, inoculados com a cepa 72 de *C. glabrata*, como descrito em Materiais e Métodos.

de etanol. Resultados semelhantes foram obtidos quando o crescimento em glicose ou trealose foi analisado com uma outra linhagem (cepa LEMI 6099) de *C. glabrata*.

Dentre os resultados, particularmente, a produção de significativas quantidades de glicose no sobrenadante de cultivo, quando as células cresciam utilizando trealose como fonte de carbono, indicava a possível existência de uma trealase extracelular na levedura *C. glabrata*. Desse modo, um método já descrito (SILVEIRA et al., 1996) para se determinar a atividade da enzima extracelular invertase em *S. cerevisiae*, foi usado para dosar uma possível trealase extracelular em *C. glabrata*. Neste método, as células são pré-incubadas na presença de fluoreto de sódio para inibir a enolase (e, portanto, bloquear a via glicolítica), permitindo que qualquer molécula de glicose produzida, não seja metabolizada e/ou degradada pela célula; o que levaria a subestimar a presença de uma glicosidase extracelular e/ou associada à parede celular (vide SILVEIRA et al., 1996). Quando esta metodologia foi aplicada à *C. glabrata*, significativa produção de glicose foi verificada pelas células incubadas na presença de trealose. Visando caracterizar a atividade enzimática, inicialmente avaliamos a influência do pH e da concentração de substrato no ensaio enzimático usando células íntegras.

Da análise da atividade trealase nas células íntegras, em diferentes pHs (na faixa de pH 3 a 9), notou-se que a maior atividade foi detectada em meio ácido, próximo de pH 4,0 (Figura IV.6). A seguir, a atividade foi analisada numa faixa mais estreita de pH, entre os pHs 3,6 a 4,6, com intervalos de pH 0,2. Os resultados obtidos indicaram que o pH ótimo para a trealase ácida de *C. glabrata* é o pH 4,4 (dados não mostrados). A análise da atividade em diferentes concentrações de trealose (Figura IV.7) mostrou uma típica cinética enzimática, com uma velocidade máxima $V_{max} = 162$ mU (mg célula)⁻¹ e uma afinidade aparente $K_m = 18$ mM para as células íntegras. Esta atividade trealase ácida associada à parede celular de *C. glabrata* (162 mU [mg célula]⁻¹) foi cerca de 100 vezes maior quando comparada com a encontrada em *S. cerevisiae* (1,5 mU [mg célula]⁻¹) utilizando a mesma metodologia de dosagem enzimática (vide também JULES et al., 2004).

Considerando que *C. glabrata* apresentava significativa atividade enzimática nas células íntegras, indicando uma possível associação com a parede celular, verificamos a seguir se esta levedura estaria, ou não, secretando a enzima para o meio de cultura. Com esse objetivo, amostras de meio de cultura rico YP contendo 2% trealose e inoculadas com células de *C. glabrata* foram coletadas na fase exponencial do

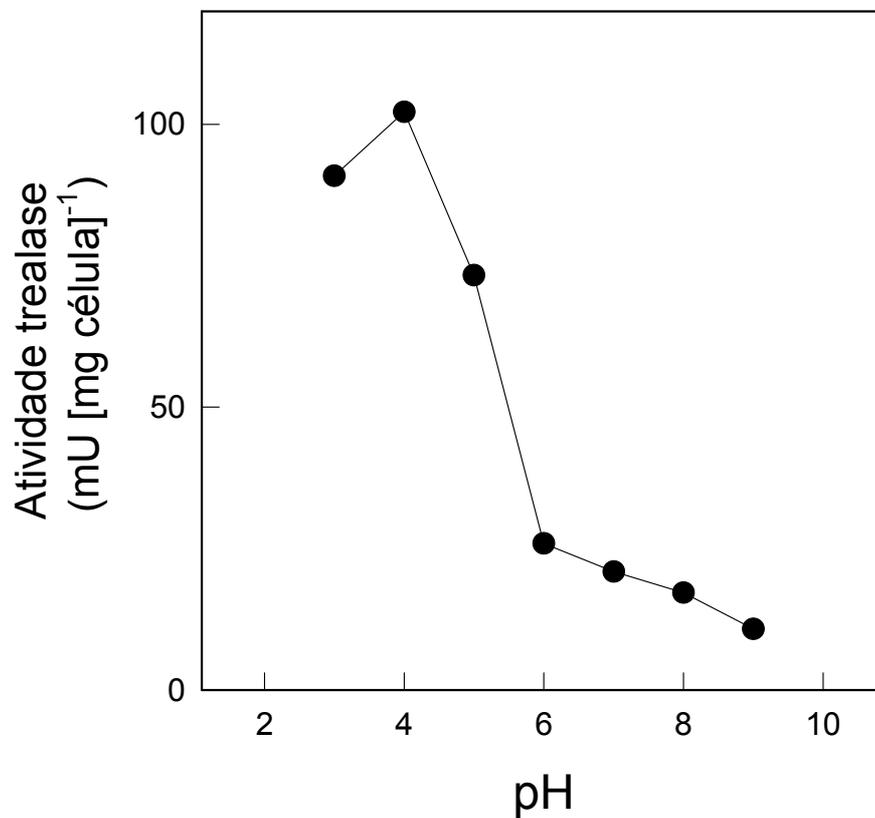


Figura IV.6. Efeito do pH na atividade trealase em células íntegras de *C. glabrata*. Células da cepa 72 de *C. glabrata*, crescidas em meio de cultura rico YP com 2% de trealose, foram utilizadas para determinar a atividade trealase extracelular nos pHs indicados (obtidos com tampão 100 mM succinato ajustado para o pH correspondente com Tris), na presença de fluoreto de sódio e utilizando-se 100 mM trealose como substrato, como descrito em Materiais e Métodos.

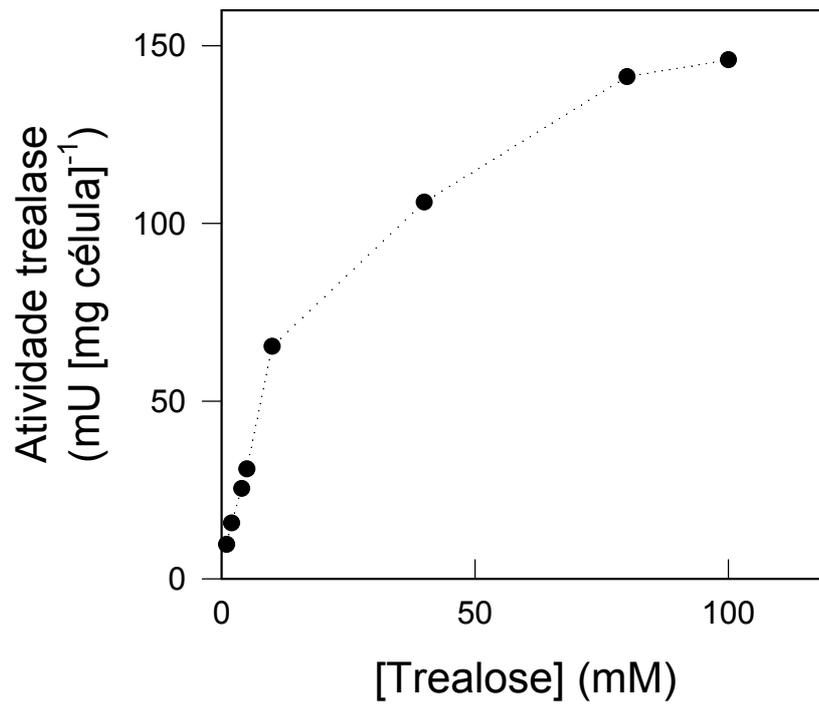


Figura IV.7. Análise cinética da atividade trealase em células íntegras de *C. glabrata*.

Células da cepa 72 de *C. glabrata*, crescidas em meio de cultura rico YP com 2% de trealose, foram utilizadas para determinar a atividade trealase extracelular nas concentrações indicadas do substrato trealose, como descrito em Materiais e Métodos.

crescimento, centrifugadas para remoção das células, e o sobrenadante filtrado em filtro Millipore com poro de 0,22 μm para remover eventuais células que poderiam ainda estar contaminando o sobrenadante de cultura, mesmo após centrifugação. Ao utilizar este sobrenadante para determinar a atividade trealase, significativa produção de glicose foi observada ($470 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$), indicando que as células de *C. glabrata* estavam secretando uma trealase no meio de cultura.

Para caracterizar a expressão e/ou produção da trealase celular e da trealase secretada no meio, foi escolhida a linhagem LEMI 6099 por apresentar um crescimento rápido em meio mínimo contendo trealose como fonte de carbono (Figura IV.8), se comparado à linhagem 72 (vide Fig. IV.5). Quando a cepa LEMI 6099 foi inoculada no meio YNB com trealose, a fase *lag* foi reduzida pela metade ($\sim 30 \text{ h}$), e a concentração de glicose produzida no meio foi duas a três vezes maior do que a obtida com a linhagem 72, embora as concentrações de etanol tenham sido praticamente idênticas para ambas as cepas (vide Fig. IV.5 e IV.8).

Na Fig. IV.8 estão apresentados também resultados preliminares visando verificar possíveis mecanismos regulatórios envolvidos na utilização de trealose por *C. glabrata*. Quando as células foram crescidas em glicose, e coletadas quando ainda existia glicose no meio (neste momento, portanto, as células se encontrariam reprimidas pela glicose), o início do crescimento em trealose foi mais lento do que com células pré-crescidas em trealose, produzindo etanol mais lentamente e menor concentração de glicose no meio de cultura (Fig. IV.8). Embora estes resultados sugiram que as enzimas envolvidas no catabolismo da trealose sejam reprimidas pela glicose, aparentemente, a trealose não pode ser considerada um verdadeiro açúcar indutor, uma vez que, células pré-crescidas em glicerol (uma fonte de carbono não repressora) foram capaz de crescer e fermentar a trealose com cinéticas praticamente idênticas à de células pré-crescidas em trealose (Fig. IV.8). Então, decidiu-se por melhor caracterizar a expressão das trealases ao longo do crescimento da linhagem LEMI 6099 em meios contendo glicose, trealose ou glicerol como fonte de carbono, e desta forma poder verificar se o catabolismo da trealose em *C. glabrata* é, ou não é, induzido pela presença deste dissacarídeo no meio de cultura.

Quando as células da linhagem LEMI 6099 crescem em meio rico com glicose, a atividade trealase só aparece após o consumo da fonte de carbono (Figura IV.9). Inicialmente, é observado o aparecimento da atividade trealase celular, atingindo seu ápice 4 horas após a depleção da glicose do meio. A seguir, a atividade decai ao longo

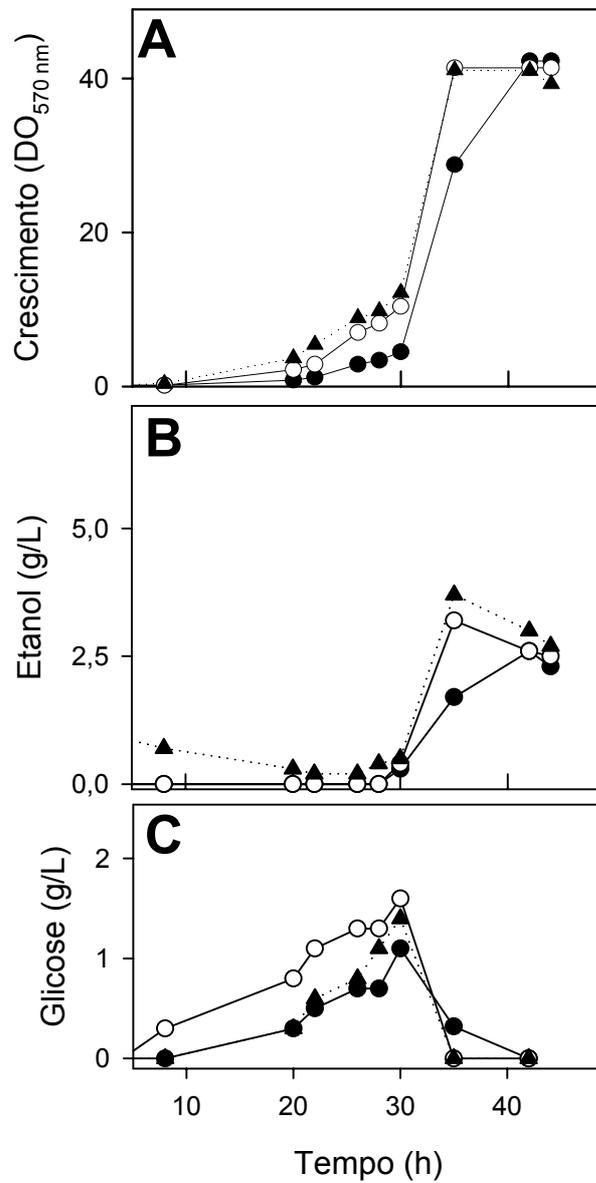


Figura IV.8. Efeito do pre-crescimento em diferentes fontes de carbono na capacidade de *C. glabrata* catabolizar a trealose. Células da cepa LEMI 6099, previamente crescida em meio mínimo YNB contendo 4% de glicose (-●-), 2% de trealose (-○-) ou 3% de glicerol e 2% etanol (-▲-), foram inoculadas em meio mínimo YNB com 2% de trealose e o crescimento (A), a produção de etanol (B) e de glicose (C) no meio foram determinados como descrito em Materiais e Métodos.

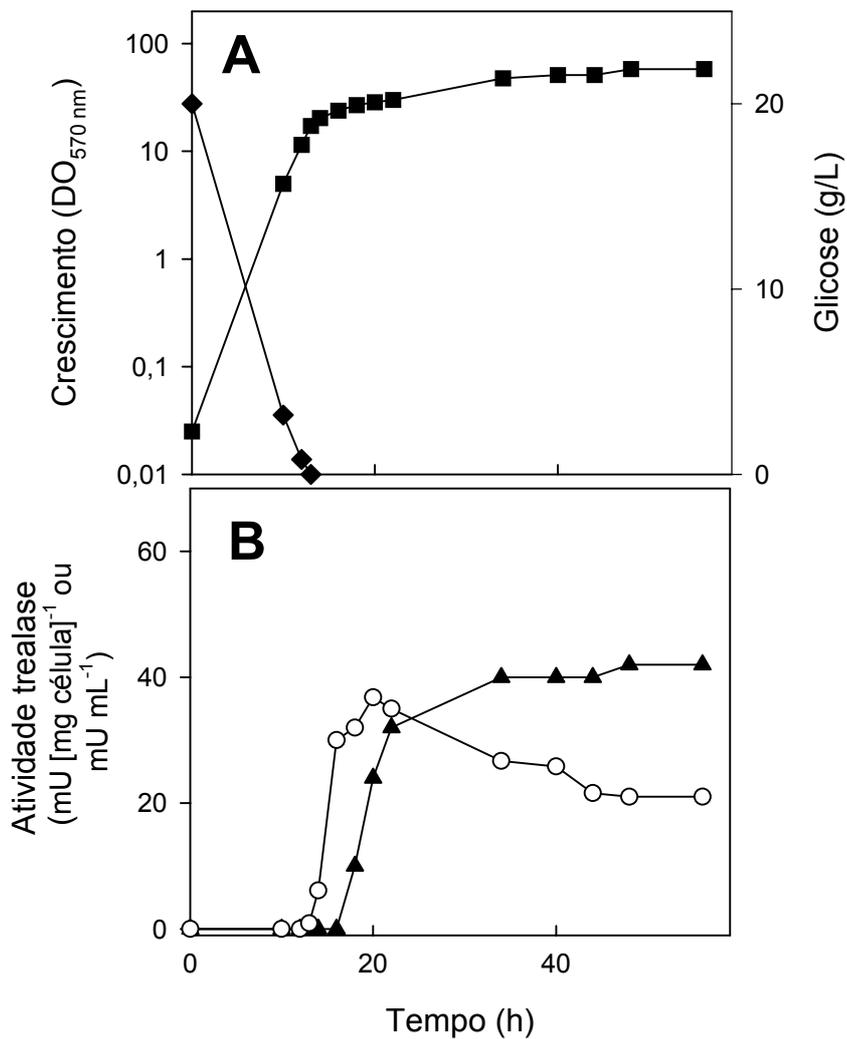


Figura IV.9. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de *C. glabrata* em meio rico YP contendo 2% glicose como fonte de carbono. O crescimento (-■-), a atividade trealase celular (-o-), a atividade trealase no sobrenadante (-▲-) e o consumo de glicose (-◆-) foram determinados ao longo do crescimento da cepa LEMI 6099 em meio rico YP contendo 2% glicose como descrito em Materiais e Métodos.

do tempo, atingindo valores ~50% menores no final do crescimento (Fig. IV.9). Aproximadamente 2 horas após o surgimento da atividade trealase celular, começa a detecção da enzima secretada no meio de cultura, que se acumula até atingir valores máximos ao final do crescimento (Fig. IV.9). Analisando a atividade trealase total por unidade de volume de meio de cultura, verificamos que a maior parte dela é encontrada associada às células, e apenas $8,5 \pm 1,5\%$ da atividade é secretada para o meio. De qualquer forma, estes resultados da expressão das trealases durante o crescimento em glicose confirmam o efeito repressor deste açúcar sobre a utilização de trealose por *C. glabrata* (vide Fig. IV.8).

Como já reportado para a cepa 72 (Fig. IV.5), o crescimento da linhagem LEMI 6099 em trealose ocorre mais lentamente (Figura IV.10) do que em glicose, mas a atividade trealase aparece em altos níveis ainda na fase exponencial do crescimento. A atividade trealase celular durante o catabolismo da trealose atinge valores três vezes maiores dos observados durante o crescimento em glicose (vide Fig. IV.9 e IV.10), embora o padrão de expressão desta enzima nas células seja semelhante. Novamente, a atividade trealase secretada no meio de cultura aparece depois da expressão da atividade nas células, e se acumula no meio até atingir valores 10-12 vezes superiores aos encontrados durante o crescimento em glicose.

Embora estes resultados indiquem que a trealose seja um indutor da atividade trealase em *C. glabrata*, o perfil de expressão da atividade em células crescidas em glicerol atingiu valores de expressão altos e semelhantes para a trealase celular, e significativamente maiores, no caso da trealase secretada para o meio de cultura (Figura IV.11). Estes resultados obtidos com células crescidas em glicerol não só sugerem que a presença de trealose não seja indutora da atividade trealase, mas, sobretudo, que basta as células estarem desreprimidas pela fonte de carbono para que a atividade trealase apareça em altos níveis. Entretanto, é importante salientar que a porcentagem da enzima secretada para o meio aumentou significativamente durante o crescimento em trealose ou glicerol, atingindo aproximadamente $30 \pm 5\%$ da atividade trealase total produzida pelas células durante o crescimento. Ao analisar a expressão da trealase celular e a trealase secretada no sobrenadante por diversas linhagens de *C. glabrata* (Tabela IV.1), foi verificado um padrão semelhante ao já descrito para a cepa LEMI 6099.

Logicamente que tentar purificar e analisar a atividade trealase secretada pelas células constituía uma estratégia mais direta, uma vez que a complexidade de

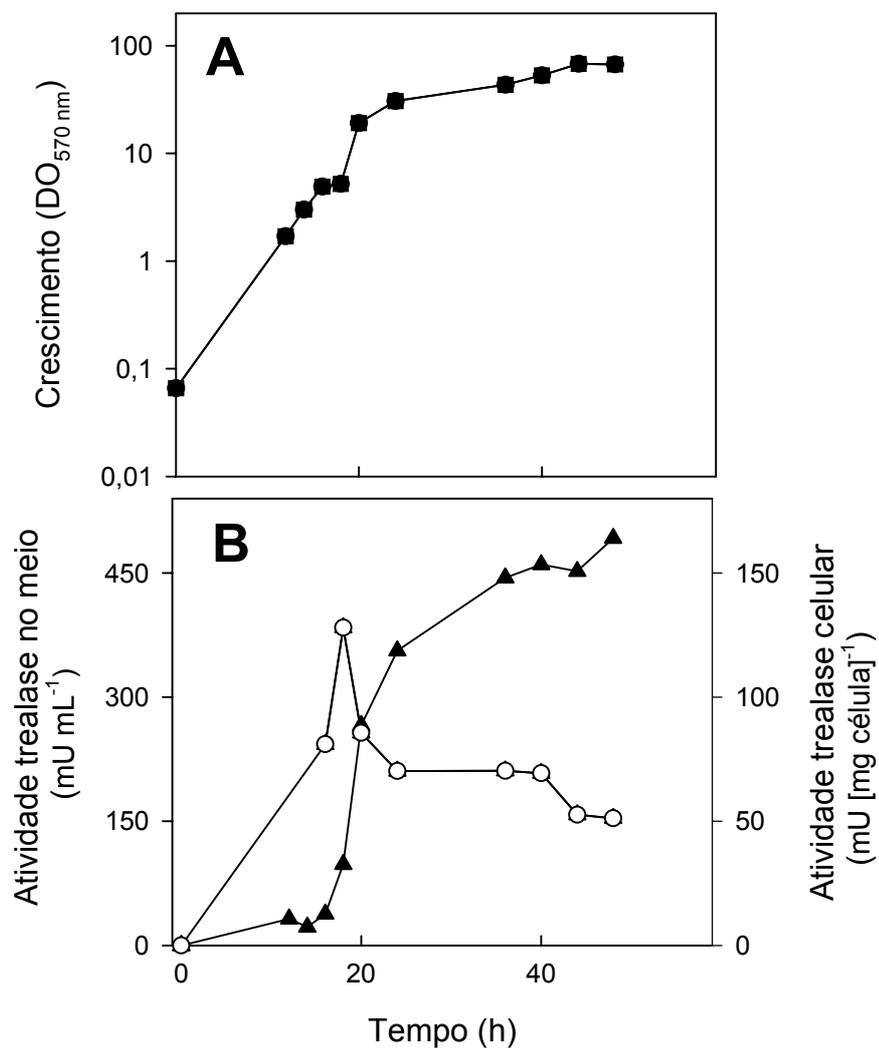


Figura IV.10. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de *C. glabrata* em meio rico YP contendo 2% trealose como fonte de carbono. O crescimento (-■-), a atividade trealase celular (-o-) e a atividade trealase no sobrenadante (-▲-) foram determinados ao longo do crescimento da cepa LEMI 6099 em meio rico YP contendo 2% trealose como descrito em Materiais e Métodos.

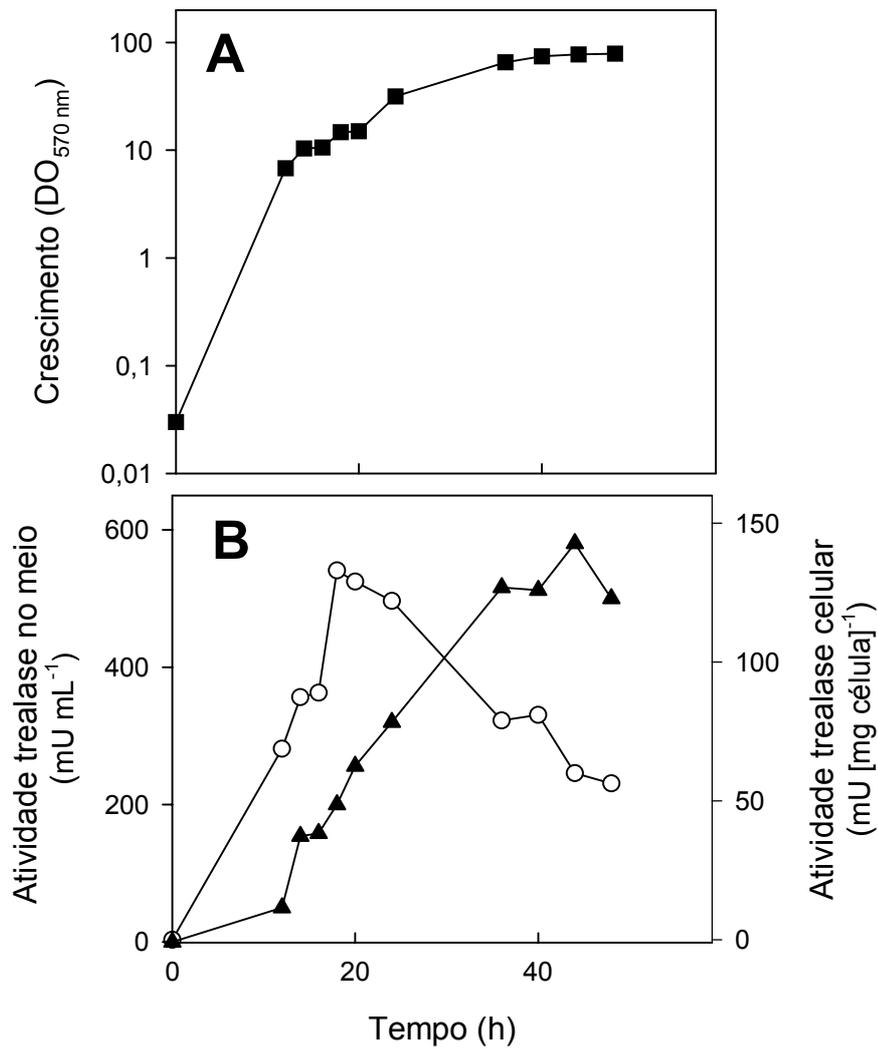


Figura IV.11. Atividade trealase celular e trealase extracelular ao longo do crescimento de *C. glabrata* em meio rico YP contendo 3% glicerol como fonte de carbono. O crescimento (-■-), a atividade trealase celular (-o-) e a atividade trealase no sobrenadante (-▲-) foram determinados ao longo do crescimento da cepa LEMI 6099 em meio rico YP contendo 3% glicerol como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela IV.1. Comparação da atividade trealase celular e secretada por linhagens de *C. glabrata* crescidas em glicose, trealose ou glicerol.

Cepa:	Atividade celular (mU [mg célula]⁻¹) após crescimento^a em:			Atividade secretada (mU mL⁻¹) após crescimento^a em:		
	glicose	trealose	glicerol	glicose	trealose	glicerol
72	54	154	142	45	470	350
LEMI 6099	37	86	129	24	266	256
LEMI 8228	78	146	142	66	480	270
Bg2	42	164	142	12	456	140
Bg14	68	104	173	10	306	254

^aAs atividades foram determinadas após ~20 h de crescimento nas indicadas fontes de carbono, como descrito em Materiais e Métodos.

proteínas secretadas pelas células é inferior às encontradas na própria célula. O meio mínimo definido YNB pareceu-nos uma opção lógica, mas, lamentavelmente, não fomos capazes de detectar nenhuma atividade trealase extracelular após o crescimento em meio YNB, com qualquer uma das diferentes fontes de carbono mencionadas. Isto poderia ser explicado pelos baixos níveis de atividade trealase celular ($\sim 10 \text{ mU [mg célula]}^{-1}$) encontrados quando *C. glabrata* foi crescida em meio sintético YNB. Como era necessário também substituir a trealose como fonte de carbono (dado seu alto custo), optou-se por purificar a atividade trealase extracelular de células crescidas em meio rico YP contendo 3% glicerol como fonte de carbono. Os resultados já indicavam que estas condições permitiam a máxima produção de enzima (Figs. IV.9-11), e uma análise das várias linhagens disponíveis no laboratório identificou a cepa LEMI 8228 como capaz de produzir uma alta ($\sim 1 \text{ U mL}^{-1}$) atividade trealase secretada no meio de cultivo após ~ 2 dias de crescimento em glicerol (Figura IV.12).

Desta forma, com o intuito de purificar e caracterizar bioquimicamente a trealase secretada para o meio de cultura por *C. glabrata*, grandes volumes (tipicamente 2 L) de meio YP-3% glicerol foram inoculados com células da linhagem LEMI 8228. Após o crescimento, as células foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes coletados. A análise por eletroforese de proteínas através de SDS-PAGE dos sobrenadantes indicava a presença de inúmeras bandas proteicas, mas em tão pouca quantidade que tornava difícil sua visualização (dados não mostrados). Considerando que seria necessário concentrar o sobrenadante para purificar e analisar bioquimicamente a trealase secretada por *C. glabrata*, a seguir foi avaliada a estabilidade da enzima. A atividade trealase presente no sobrenadante de cultura mostrou-se bastante estável, resistindo até três passos seguidos de congelamento e descongelamento, e mantendo também sua atividade mesmo após permanecer congelada durante pelo menos 15 dias. Desta forma, geralmente os sobrenadantes eram concentrados por liofilização até 1/10 do seu volume inicial, e a seguir dialisados e/ou mais concentrados (15-20 vezes) por centrifugação em microconcentradores Amicon[®] Centricon[®] YM 50 (Millipore), utilizando tampão 10 mM fosfato de sódio, pH 7,4.

As proteínas presentes nestes sobrenadantes de cultura foram separadas por cromatografia de filtração em gel utilizando a resina Superdex S-200 (vide Materiais e Métodos). O cromatograma mostrado na Figura IV.13 mostra que o pico de atividade enzimática foi obtido com um volume de eluição de 11-11,5 mL. Uma região do

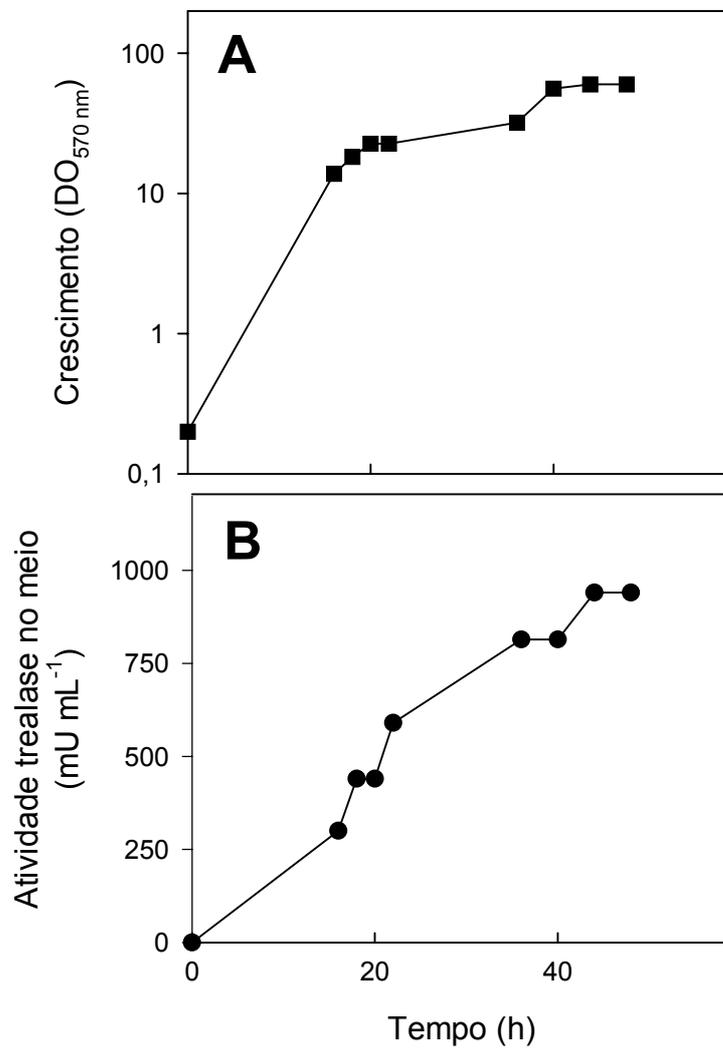


Figura IV.12. Atividade trealase extracelular ao longo do crescimento da linhagem LEMI 8228 em meio rico YP contendo 3% glicerol como fonte de carbono. O crescimento (-■-) e a atividade trealase no sobrenadante (-●-) foram determinados ao longo do crescimento das células de *C. glabrata* em meio rico contendo 3% de glicerol como descrito em Materiais e Métodos.

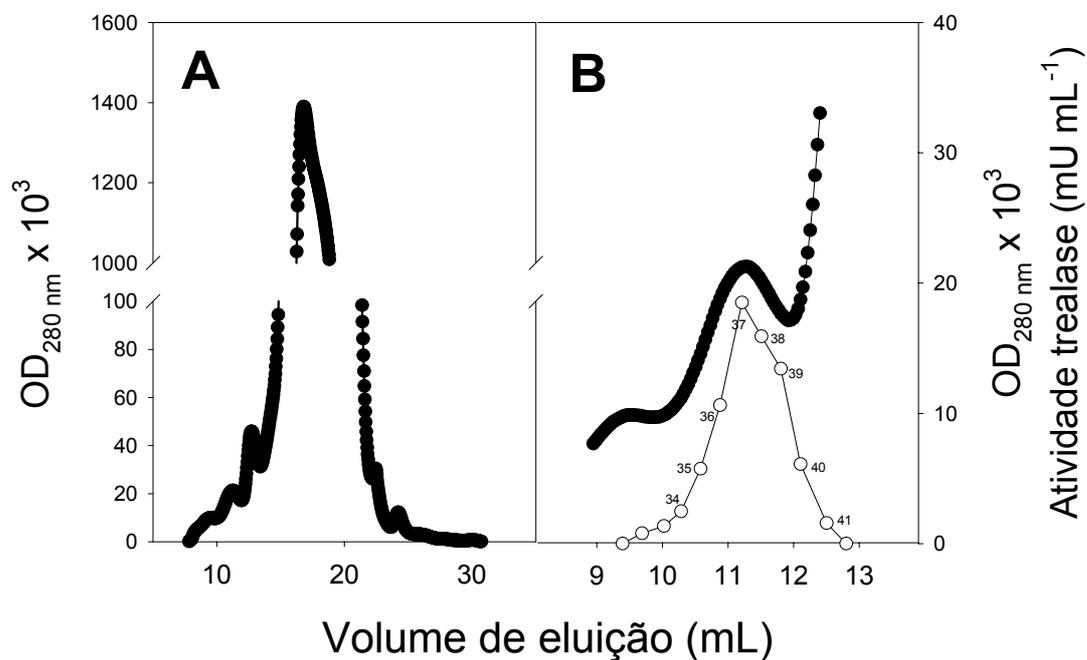


Figura IV.13. Cromatograma do sobrenadante de cultura analisado por filtração em gel em coluna Superdex S-200. Na coluna, previamente equilibrada com tampão 100 mM succinato-Tris (pH 4,4) contendo 10% glicerol, foram aplicados 100 μ l da amostra (sobrenadante concentrado contendo 108 U trealase [mg proteína]⁻¹). A cromatografia foi realizada no mesmo tampão sob um fluxo de 0,75 mL min⁻¹, e frações de 300 μ l foram coletadas durante a eluição das proteínas (determinadas espectrofotometricamente a 280 nm, -●-) para determinação da atividade trealase (-○-). No painel **A** é mostrado todo o perfil cromatográfico, e no painel **B** o perfil proteico e de atividade trealase entre os 9 a 13 mL de volume de eluição.

cromatograma com pouca concentração proteica, sendo a fração de número 37 a que apresentou a máxima atividade enzimática, coincidindo com um pequeno pico proteico do cromatograma (Fig. IV.13B). Considerando que a atividade trealase específica no meio de cultivo era de 27 U [mg de proteína]⁻¹, a enzima foi purificada pelo menos 8-10 vezes após a filtração em gel, atingindo uma atividade específica de 226 U [mg de proteína]⁻¹ neste experimento. Entretanto, estes números são apenas estimativas, já que a concentração proteica encontrada tanto no sobrenadante de cultura, quanto nas frações após a cromatografia, é extremamente baixa, o que dificulta a precisão no cálculo da atividade específica. De qualquer forma, a cromatografia de filtração em gel nos permitiu também estimar a massa molecular da enzima em seu estado nativo, o pico de atividade enzimática apresenta uma massa molecular aparente de aproximadamente 275 kDa (Figura IV.14).

Entretanto, a análise das proteínas existentes nas frações com atividade trealase através de SDS-PAGE (Figura IV.15) não revelou nenhuma proteína enriquecida nessa alta faixa de peso molecular, mas apenas, uma proteína de aproximadamente 130 kDa presente nas frações (37 e 38) com maior atividade enzimática. Outras duas bandas protéicas de pesos moleculares aparentes entre 50 e 66 kDa foram visualizadas em todas as frações, mas elas também foram abundantes em frações sem atividade enzimática (Figura IV.16, vide também as Fig. IV.13 e IV.15), indicando que estas proteínas, provavelmente, não fazem parte de nenhum complexo com a trealase secretada por *C. glabrata*. O perfil cromatográfico durante a filtração em gel e a atividade enzimática de uma outra partida de sobrenadante de cultura concentrado (Figura IV.17), embora com uma resolução não tão boa como a mostrada na Fig. IV.13, novamente mostra um pico de atividade que coincidiu com uma maior abundância de uma proteína difusa de ~130 kDa, proteína presente em menor quantidade no sobrenadante e, portanto, provavelmente concentrada durante a purificação (Figura IV.18).

Os resultados mostrados sugerem que a enzima trealase secretada por *C. glabrata* seja ativa provavelmente na forma de um dímero, formado a partir de duas unidades de ~130 kDa, e a ampla difusão que esta proteína apresentou em SDS-PAGE sugere tratar-se de uma glicoproteína. Desta forma, foi analisada a possibilidade de uma purificação maior da enzima, utilizando a cromatografia de afinidade com uma lectina, a Conavalina A. Os resultados mostraram claramente que

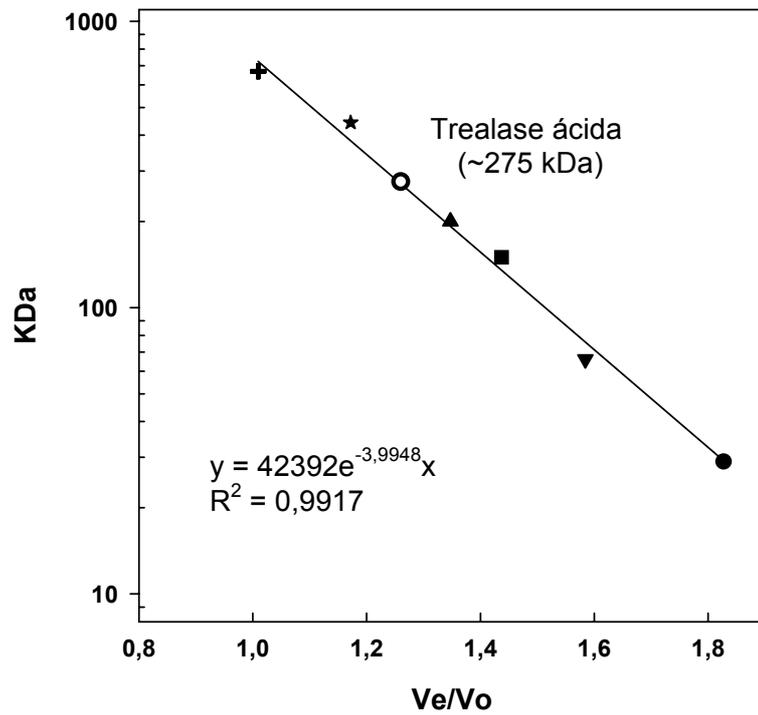


Figura IV.14. Determinação da massa molecular da fração com atividade trealase secretada por *C. glabrata*. A coluna foi calibrada utilizando padrões de peso molecular MW/GF1000 (Sigma) contendo anidrase carbônica bovina (29 kDa, ●), albumina sérica bovina (66 kDa, ▼), álcool desidrogenase (150 kDa, ■), amilase (200 kDa, ▲), anfotericina de baço de cavalo (443 kDa,*), e tiroglobulina bovina (669 kDa, +) Através da curva obtida, estimamos o tamanho molecular da trealase ativa (fração 37 da filtração em gel, o). O volume morto (Vo) da coluna é 8 mL.

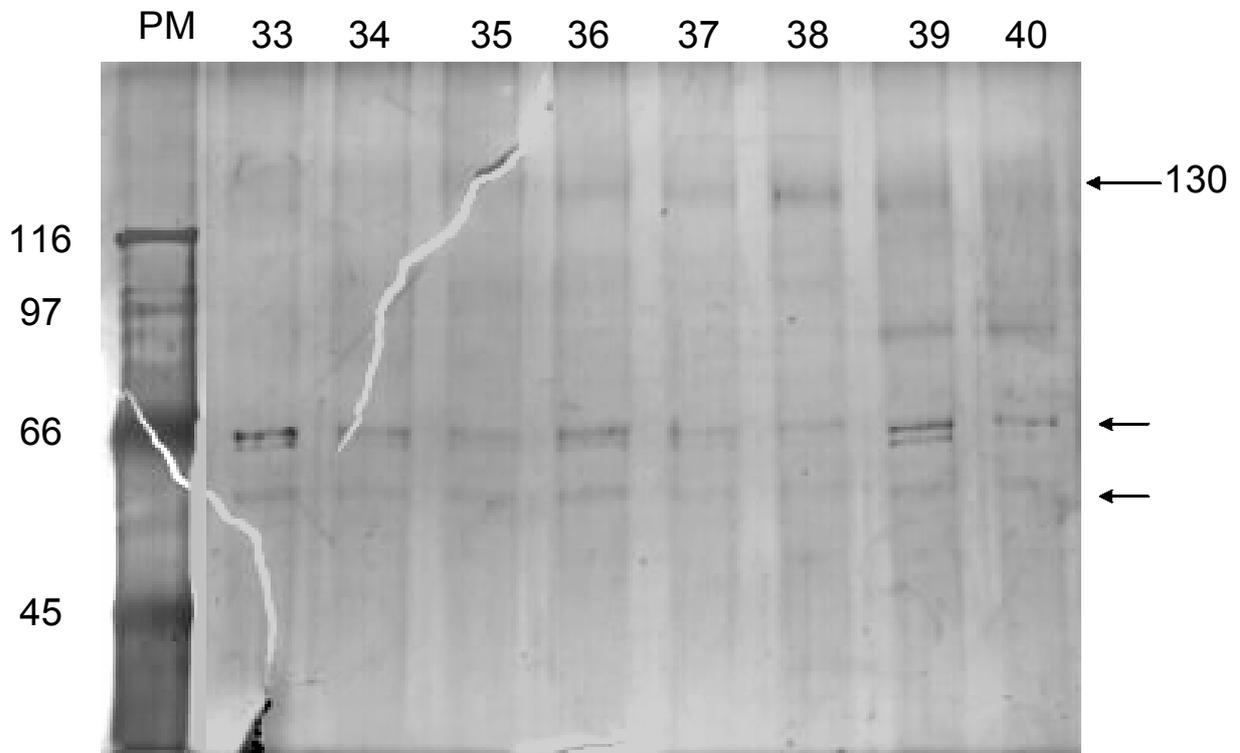


Figura IV.15. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações com atividade trealase eluidas da filtração em gel. As frações 33 a 40 da filtração em gel em Superdex S-200 que apresentavam atividade trealase foram precipitadas com 10% ácido tricloroacético, lavadas com acetona gelada, ressuspensas em tampão de amostra e aplicadas num gel de 7,5% poliacrilamida. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de prata, e os padrões de peso molecular, indicados à esquerda da figura, correspondem às proteínas β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e ovoalbumina (45 kDa). A proteína de 130 kDa é ressaltada, bem como outras com menor massa aparente.

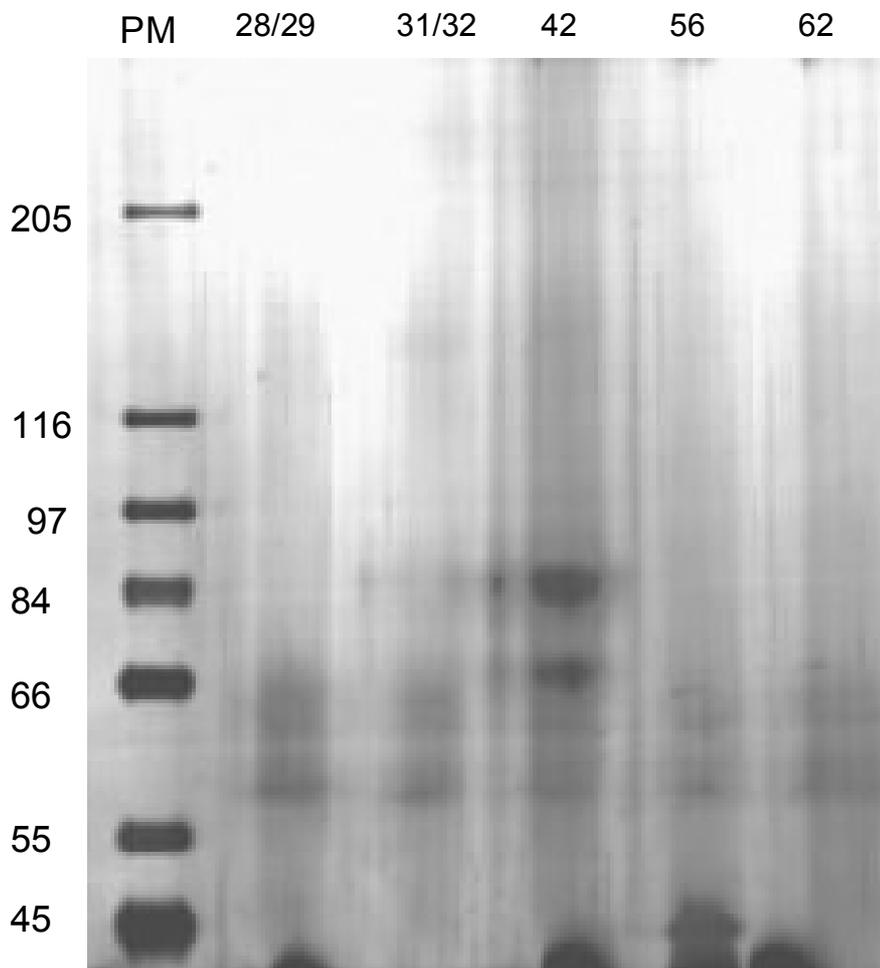


Figura IV.16. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações vizinhas às com atividade trealase eluídas da filtração em gel. As frações 31/32, 42 e 56 (correspondentes aos ápices dos demais picos protéicos da filtração em gel em Superdex S-200) foram precipitadas com 10% ácido tricloroacético, lavadas com acetona gelada, ressuspensas em tampão de amostra e aplicadas num gel de 7,5% poliacrilamida. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de prata, e os padrões de peso molecular, indicados à esquerda da figura, correspondem às proteínas miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamina desidrogenase (55 kDa) e ovoalbumina (45 kDa).

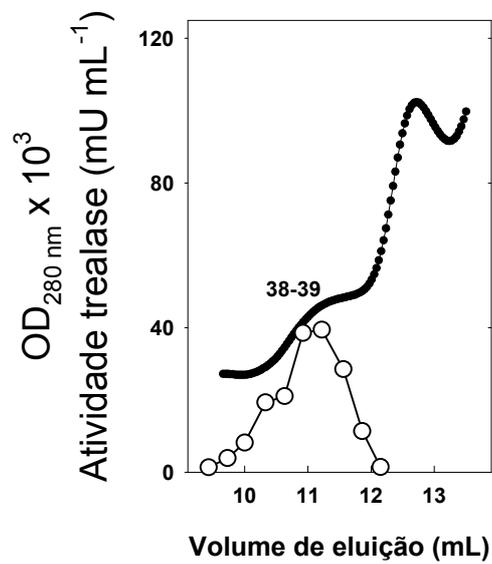


Figura IV.17. Cromatograma de uma outra amostra de sobrenadante de cultura analisado por filtração em gel em coluna Superdex S-200. A cromatografia foi realizada como descrito na Figura IV.13, e a eluição das proteínas em cada fração foram determinadas espectrofotometricamente a 280 nm (●-), bem como a atividade trealase (-○-) em cada fração, como descrito em Materiais e Métodos.

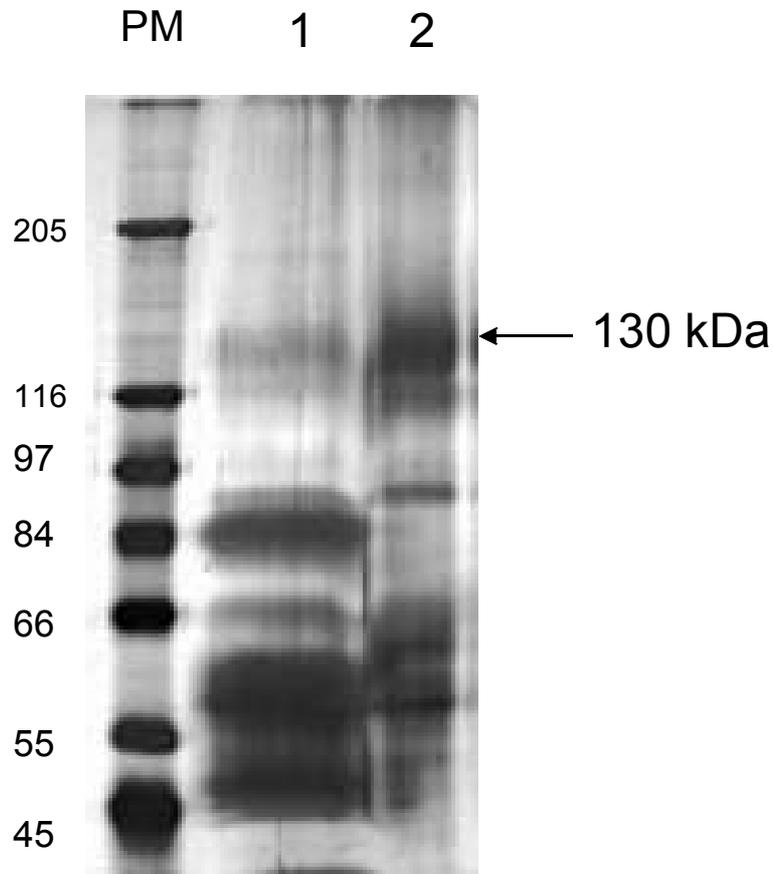


Figura IV.18. Eletroforese (SDS-PAGE) das frações com atividade trealase eluídas da filtração em gel em Superdex S-200 mostrada na Figura IV.17. Aproximadamente 1 μ l do sobrenadante de cultura (liofilizado e concentrado), e das frações 38 e 39 da filtração em gel em Superdex S-200 que apresentavam atividade trealase foram precipitadas com 10% ácido tricloroacético, lavadas com acetona gelada, ressuspensas em tampão de amostra e aplicadas num gel de 7,5% poliácridamida em 1 e 2, respectivamente. Após a eletroforese o gel foi corado com solução de prata, e os padrões de peso molecular indicados à esquerda da Figura IV. correspondem às proteínas miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamina desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa).

a atividade trealase presente nos sobrenadante de cultura concentrados ou em diferentes frações da filtração em gel, ficava retida nesta resina (seja em experimentos em batelada ou utilizando colunas contendo a ConA-Sepharose 4B), indicando que a enzima é uma glicoproteína, com resíduos glicídicos reconhecidos por esta lectina. Entretanto, lamentavelmente, não foi possível eluir a enzima da resina, seja utilizando altas (2 M) concentrações de açúcares (α -metil-D-manosídeo e α -metil-D-glicosídeo) conhecidamente ligantes e/ou competidores pela lectina (e, portanto, reconhecidos agentes eluidores neste tipo de cromatografia), ou ainda outros protocolos alternativos com o uso de altas concentrações salinas, álcoois, detergentes, ou pH ácido. Nenhuma destas estratégias (ou combinações delas, vide Materiais e Métodos) foi capaz de eluir a atividade trealase presa na resina, embora a atividade enzimática pudesse ser facilmente detectada na resina ainda após esses tratamentos (com exceção do tratamento com Triton X-100 que inativou a enzima). A tentativa de eluir a enzima diretamente com tampão de amostra para posterior análise por SDS-PAGE apresentou um padrão de bandas complexo; uma vez que a resina ConA-Sepharose 4B (sem ter aplicado qualquer amostra, e contendo a atividade trealase extracelular) já apresentava inúmeras bandas proteicas na eletroforese (dados não mostrados).

De qualquer forma, as propriedades cinéticas e especificidade da fração contendo a enzima de *C. glabrata* parcialmente purificada foram caracterizadas. Os resultados indicam que esta trealase apresentou um típico comportamento para uma enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten, com uma afinidade (K_m) de 3,4 mM e uma V_{max} de 80 U [mg proteína]⁻¹ (Figura IV.19). Por outro lado, a enzima secretada por *C. glabrata* é aparentemente específica para a trealose, sendo incapaz de hidrolisar uma série de outros α -glicosídeos testados (Tabela IV.2).

No intuito de melhor caracterizar a trealase ácida secretada por *C. glabrata*, realizou-se uma análise *in silico* do genoma desta levedura na procura de um possível gene que codificasse para uma trealase ácida. Utilizando os recursos de busca e análise genômica para *C. glabrata* disponíveis na internet (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob>, <http://cbi.labri.fr/Genolevures>), o gene *CAGLOK05137g* foi identificado como sendo o provável responsável pela síntese de uma trealase ácida nesta levedura patogênica. Este gene apresenta 60% de homologia com o gene da trealase ácida (*ATH1*) em *S. cerevisiae*, sendo ambos os genes são encontrados no mesmo contexto cromossomal, sugerindo uma origem conservada para este gene nas leveduras.

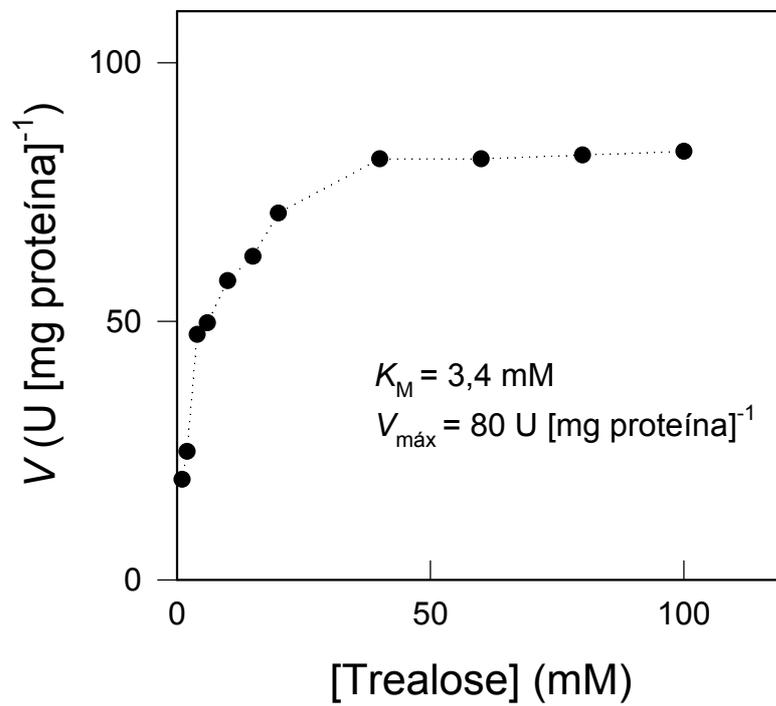


Figura IV.19. Análise cinética da atividade trealase extracelular de *C. glabrata*. Um *pool* de frações (12 a 14) contendo a atividade trealase extracelular, obtidas após cromatografia em filtração em gel na coluna Superdex S-200 como descrito na Figura IV.13, foi utilizado para determinar a atividade trealase nas indicadas concentrações do substrato trealose, como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela IV.2. Especificidade da Trealase extracelular de *C. glabrata*.

Substrato ^a	Estrutura	Hidrólise ^b (U [mg proteína] ⁻¹)
Trealose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicopiranosídeo	128
Maltose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicopiranosídeo	0
Sacarose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo	0
Turanose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D-frutose	0
Melezitose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-glicopiranosídeo	0
<i>p</i> -nitrofenil- α -glicosídeo	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo	0
α -metil-glicosídeo	metil- α -D-glicopiranosídeo	0

^aTodos na concentração final de 100 mM, menos o *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo que foi incubado na concentração final de 20 mM. ^bQuantidade de glicose produzida após incubação dos substratos, com a enzima parcialmente purificada, por 30 min em tampão 100 mM succinato-Tris, pH 4,4, e determinada como descrito em Materiais e Métodos. No caso do *p*-nitrofenil- α -glicosídeo, a liberação do produto cromogênico *p*-nitrofenol foi também quantificado espectrofotometricamente a 400 nm ($\Delta\epsilon = 7,48 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Com o objetivo de verificar se de fato este gene codifica para a trealase ácida caracterizada neste trabalho, foi proposto deletar do genoma desta levedura o gene, e analisar as possíveis mudanças fenotípicas que poderiam ocorrer com o catabolismo da trealose em *C. glabrata*. Para isso, foi utilizada a técnica de recombinação homóloga com regiões flangeadoras longas (PERSON; HERNANDO; SCHWEIZER, 1998). Nesta estratégia, através de PCR e utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores *P1-P2* e *P3-P4* (vide Materiais e Métodos, Tabela III.2) são amplificados a partir do DNA de *C. glabrata* dois fragmentos de DNA com 380 e 447 pb que correspondem à sequência encontrada imediatamente acima do códon de iniciação, e imediatamente após o códon de terminação do gene *CAGLOK05137g*. Estes fragmentos de DNA por sua vez, servem como iniciadores (através de sequências específicas presentes nos oligonucleotídeos *P2* e *P4*, vide Tabela III.2), para amplificar um gene marcador (o chamado módulo de deleção) que será utilizado na seleção dos transformantes.

A Figura VI.20 apresenta uma eletroforese mostrando o produto do PCR quando os dois fragmentos de DNA (visíveis na eletroforese) amplificaram o gene *kan^R* presente no plasmídeo pFA6a-kanMX6. Desta forma é obtido um fragmento maior, o módulo de deleção, contendo a sequência de DNA da região acima do gene em análise, seguido do gene que confere resistência à Geneticina, e terminando com a sequência de DNA imediatamente acima do final do gene *CAGLOK05137g*. Quando uma levedura é transformada com este fragmento de DNA linear, as regiões homólogas podem parear com o gene no cromossoma e, através de recombinação homóloga, o gene *kan^R* passa a substituí-lo, criando uma linhagem resistente à geneticina e deletada especificamente no gene desejado. Inicialmente os fragmentos de DNA foram amplificados a partir do genoma da linhagem LEMI 8228, e utilizados para amplificar o gene *kan^R*. Entretanto, nossos resultados indicavam que as linhagens de *C. glabrata* disponíveis no laboratório eram extremamente resistentes a este antibiótico, e foi necessário até 800 µg/mL de geneticina no meio para inibir o crescimento de algumas linhagens, entre elas a LEMI 8228. Apesar da obtenção uma série de colônias que passaram a crescer em placas de meio rico contendo 800 µg/mL do antibiótico após transformação das células com o módulo de deleção, a análise fenotípica dos possíveis transformantes indicava que provavelmente se tratava de mutantes *petite* (apresentavam problemas para utilizar o glicerol como fonte de carbono), e a análise por PCR da correta inserção genômica do gene *kan^R* confirmou a não integração deste gene no lugar do gene *CAGLOK05137g*.

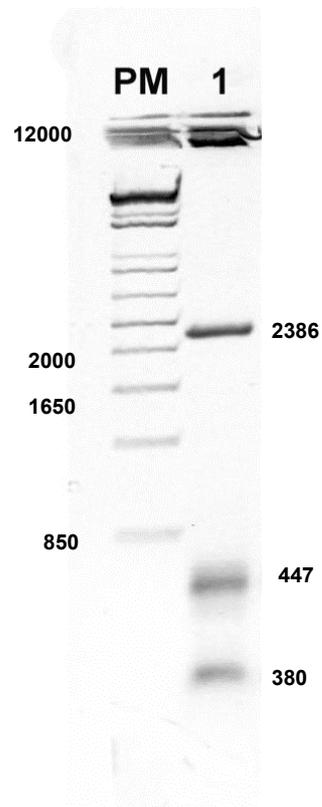


Figura IV.20. Construção do módulo de deleção do gene *CAGLOK05137g* de *C. glabrata*.

Eletroforese em gel de agarose mostrando o fragmento de DNA linear com ~2,4 kb, obtido por PCR utilizando-se os fragmentos de 380 e 447 pb para amplificar o gene *kan^R* presente no plasmídeo pFA6a-kanMX6, como descrito em Materiais e Métodos. **PM** = Padrão de DNA 1 Kb; linha **1** = Produto de PCR. Os valores indicam as massas moleculares aparentes dos fragmentos de DNA.

Como a estratégia utilizando o gene marcador que confere resistência à geneticina mostrou-se inexequível, outro gene marcador foi testado (o gene *URA3*) que permitiria o crescimento, após a transformação e integração cromossômica, de uma linhagem *ura3⁻* em meio mínimo YNB sem uracila. Foi utilizada a cepa auxotrófica *ura3⁻* Bg14 de *C. glabrata*, linhagem que apresentava atividade trealase celular e secretada no meio em níveis comparáveis às outras linhagens estudadas (vide Tabela IV.1). Lamentavelmente, esta estratégia também não funcionou, inclusive testando diferentes fontes de carbono (glicose ou glicerol) no meio YNB sem uracila utilizado para selecionar os transformantes *URA⁺*. Após várias transformações, não obtivemos cepas mutantes com a integração do módulo em substituição ao gene CAGLOK05137g.

V. Discussão

Nossos resultados indicam que *C. glabrata* é capaz de crescer em trealose e fermentar eficientemente esta fonte de carbono, produzindo significativas quantidades de etanol. O crescimento em trealose ocorre graças à presença, na superfície celular, de altos níveis de uma trealase ácida que chega, inclusive, a ser secretada para o meio de cultura. Desta forma, durante a fase exponencial de crescimento em trealose, a velocidade de hidrólise do dissacarídeo foi superior a capacidade de transporte e/ou captação pelas células da glicose gerada, resultando em um pico transitório de glicose. Neste sentido, a metabolização de trealose por *C. glabrata* é semelhante à fermentação de sacarose por *S. cerevisiae*, já que, esta última levedura secreta a invertase para o espaço periplasmático, permitindo a hidrólise extracelular do dissacarídeo, o que geralmente é acompanhado de um acúmulo de glicose e frutose no meio de cultivo (ESMON et al., 1987; HERWIG et al., 2001).

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, o grupo de J. François e colaboradores comprovaram a existência de duas vias distintas para a assimilação da trealose em *S. cerevisiae*: uma envolvendo a ação da trealase ácida codificada pelo gene *ATH1*, e outra via dependente do transporte da trealose mediado pela permease *AGT1*, seguida da hidrólise desse dissacarídeo pela trealase neutra codificada pelo gene *NTH1* (JULES et al., 2004; PARROU et al., 2005). Independentemente da via de utilização de trealose por *S. cerevisiae*, vários trabalhos têm confirmado que este açúcar não é fermentado pelas células, mas sim respirado até CO₂ e água, mesmo após sobre-expressão do gene *ATH1* que codifica para a trealase ácida nesta levedura (MALLUTA et al., 2000; JULES et al., 2004; MOURET; JACOBSEN; GUILLOUET, 2006). Entretanto, esta característica pode eventualmente ser variável, uma vez que foi reportado recentemente que algumas cepas de *S. cerevisiae* podem produzir etanol (em pequenas quantidades) quando crescidas em trealose (BASU et al., 2006).

Para determinar o envolvimento da trealase ácida na utilização da trealose extracelular por *S. cerevisiae* foi fundamental o emprego da mesma metodologia de dosagem enzimática utilizada no presente trabalho, ou seja, com prévia incubação das células com fluoreto de sódio para promover a inibição da glicólise, e assim possibilitar a dosagem das pequenas quantidades de glicose gerada pela hidrólise da trealose. O grupo de J. François e colaboradores conseguiram também demonstrar que 90% da

atividade trealase ácida em *S. cerevisiae* está associada à parede celular, e que, portanto, a trealase ácida é uma enzima periplasmática (JULES et al., 2004). A participação da trealase ácida no crescimento de *S. cerevisiae* em trealose foi um fato difícil de se imaginar, devido a convencional idéia da localização vacuolar desta enzima. No entanto, é importante salientar neste contexto que dúvidas sobre a real localização da trealase ácida surgiram durante a purificação desta enzima, uma vez que era sempre encontrada associada à invertase (uma enzima sabidamente secretada pelas células) e/ou a uma outra proteína secretada de ~40 kDa codificada pelo gene *YGP1* (MITTENBUHLER; HOLZER, 1988; 1991; DESTUELLE; HOLZER; KLIONSKY, 1994; BISWAS; GHOSH, 1996; 1998).

Resultados recentes também indicam que em *C. albicans* a trealase ácida é uma enzima associada à parede celular e necessária para o crescimento desta levedura em trealose, uma vez que mutantes sem o gene da trealase ácida (*ATC1*) foram incapazes de crescer em meio contendo trealose como única fonte de carbono (PEDREÑO et al., 2004). A incapacidade da cepa de *C. albicans* estudada no presente trabalho em crescer utilizando trealose como fonte de carbono, provavelmente se deva a mudança do pH do meio, que às 10 horas de cultivo chegou ao pH 7,6. Como o pH ótimo para o crescimento em trealose é ácido (condizente com o pH ótimo *in vitro* da trealase ácida) e a linhagem de *C. albicans* analisada foi incapaz de manter este pH ácido do meio, o consumo da trealose e seu crescimento concomitante foram interrompidos após algumas horas de crescimento. A importância do tamponamento no pH ácido para a utilização de trealose foi também reportado para *S. cerevisiae* (JULES et al., 2004). De fato, a falta de tamponamento do meio num pH ácido (pH 5,0, vide Materiais e Métodos) também impediu que *C. glabrata* crescesse em meio mínimo com trealose (resultados não mostrados).

O acúmulo de glicose no meio de cultivo contendo trealose como única fonte de carbono também foi reportado durante o crescimento de *M. rouxii*, que possui uma trealase ligada à parede celular (ALMEIDA et al., 1997) e no sobrenadante de cultura de linhagens MAT α e MAT α de *S. cerevisiae*, cuja trealase ácida é encontrada no espaço periplasmático (BASU et al., 2006).⁷ Embora, deva-se destacar que, neste último caso, a concentração de glicose liberada para o meio tenha sido ínfima, inferior a 0,8 μ moles/mL. Porém, da mesma forma, nossos resultados indicam que *C. glabrata* hidrolisa rapidamente a trealose e que o etanol formado é o produto da fermentação da glicose pelas células.

Entretanto, o produto de hidrólise da trealose (a glicose) exerce um papel repressor na utilização deste açúcar por *C. glabrata*. A repressão pela glicose é um dos mecanismos regulatórios mais estudados em leveduras, e nossos resultados vão de encontro à descrição da necessidade do gene *SNF1* de *C. glabrata* para a utilização de trealose (PETTER; KWON-CHUNG, 1996). A repressão da glicose sobre a expressão de trealases ácidas foi também reportada em *S. cerevisiae* (SAN MIGUEL; ARGUELLES, 1994), *C. albicans* (PEDREÑO et al., 2004) e em *C. utilis* (ROLIM et al., 2003). A análise dos possíveis mecanismos regulatórios envolvidos na utilização de trealose por *C. glabrata* revelou que a trealose não é um indutor, uma vez que, células pré-crescidas em glicerol (uma fonte de carbono não repressora) foram igualmente capazes de crescer e fermentar a trealose com cinéticas idênticas as das células pré-crescidas em trealose. Embora em *M. rouxii* (ALMEIDA et al., 1997) e *R. rubra* (MANSURE; SILVA; PANEK, 1992), a indução da atividade trealase por trealose tenha sido reportada, significativos níveis destas enzimas foram observadas também após indução com glicerol e/ou maltose.

Nossos resultados indicam que além da atividade trealase ácida nas células íntegras, provavelmente associada à parede celular, ocorre significativa secreção da enzima para o meio de cultura. O peso molecular aparente da enzima ativa, deduzido por filtração em gel, é de ~275 kDa. Entretanto, não foi visualizada nenhuma proteína nesta faixa de massa molecular, mas sim um polipeptídeo de aproximadamente 130 kDa, o que sugere que a proteína ativa seja um dímero. Na literatura, as trealases ácidas de leveduras têm sido descritas como monômeros em *S. cerevisiae* (MITTENBÜHLER; HOLZER, 1988) e, aparentemente como dímero em *A. nidulans* (D'ENFERT; FONTAINE, 1997). A atividade trealase presente nos sobrenadantes de cultura mostrou grande afinidade pela resina de ConA-Sepharose, indicando provável natureza glicoproteica. De fato, outras trealases ácidas já foram caracterizadas claramente como glicoproteínas (D'ENFERT; FONTAINE, 1997, AQUINO et al., 2005). Entretanto, a incapacidade de eluir a enzima da resina merece melhor caracterização, incluindo a estrutura glicídica adicionada à proteína durante sua síntese e tráfego intracelular até ser secretada pela célula. Por outro lado, a enzima parcialmente purificada demonstrou um comportamento tipicamente Michaeliano, apresentando uma afinidade pela trealose (K_m 3,4 mM) na mesma ordem de magnitude de outras trealases ácidas em fungos e leveduras, incluindo *S. cerevisiae* (K_m 1,4 mM), *Humicola grisea* (forma I, K_m 2,3 mM; forma II, K_m 0,86 mM), *T. lanuginosus* e *N. cassa* (K_m 0,57

e 0,52 mM, respectivamente), ou *Rhizopus microspurus* (K_m 0,2 mM) (LONDESBOROUGH; VARIMO, 1984; ZIMMERMANN; TEREZI; JORGE, 1990; CARDELLO; TEREZI; JORGE, 1994; BHARADWAJ; MAHESHWARI, 1999; AQUINO et al., 2005). E, como as demais trealases ácidas, é altamente específica para o dissacarídeo trealose.

Ao pesquisarmos seqüências de aminoácidos de proteínas envolvidas no metabolismo da trealose de *S. cerevisiae* no genoma de *C. glabrata* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), observamos alta homologia (60%) entre o gene *ATH1* (ALIZADEH; KLIONSKY, 1996) e o gene denominado *CAGLOK05137g* em *C. glabrata*. A seqüência de 1212 aminoácidos deduzida a partir da seqüência deste gene apresenta alta homologia (63%) com a trealase ácida (1211 aminoácidos) de *S. cerevisiae*. Esta proteína possui na sua porção N-terminal uma região hidrofóbica (aas 81-103) equivalente a um segmento transmembrana, além de 22 potenciais sítios de N-glicosilação contendo a seqüência consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (Figura V.1) (PARROU et al., 2005). Embora estas enzimas não possuam seqüências características de peptídeos sinais encontrados em enzimas secretadas para fora da célula, a significativa diferença na seqüência de aminoácidos na porção N-terminal entre a trealase ácida de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* poderia estar envolvida na eficiente secreção pelas leveduras desta última enzima, e deverá ser objeto de futuros estudos. Ambas as proteínas possuem também 3 seqüências consenso pertencentes a domínios proteicos da família de hidrolases glicídicas CAZy-65 (BATEMAN et al. 2004; PARROU et al., 2005). Características semelhantes foram descritas para as trealases ácidas deduzidas a partir dos genes *ATC1* (1078 aminoácidos) de *C. albicans* e *TREA* (1054 aminoácidos) de *A. nidullans*, embora estas enzimas possuam peptídeos sinais característicos (D'ENFERT, FONTAINE, 1997; PEDRENÕ et al., 2004; PARROU et al., 2005).

C. glabrata possui também genes ortólogos para as 8 proteínas de *S. cerevisiae* apontadas como essenciais (PARROU et al., 2005) para o crescimento em trealose e/ou expressão da trealase ácida (proteínas codificadas pelos genes *SWI3*, *ERV14*, *BST1*, *PMR1*, *GLO3*, *KNH1*, *YGP1* e *HXT5*). Porém, não encontramos nenhuma seqüência homóloga ao transportador *AGT1*, sugerindo que a assimilação de trealose por *C. glabrata* seja exclusivamente devido à trealase ácida extracelular.

Como já mencionado na introdução deste trabalho, estudos sobre a evolução do genoma em leveduras propuseram um ancestral comum para *S. cerevisiae* e *C.*

glabrata. No decorrer da evolução, ocorreu uma sistemática perda de genes do genoma de *C. glabrata*, sendo vários deles justamente envolvidos na utilização de fontes de carbono como galactose (genes *GAL1*, *GAL2*, *GAL3*, *GAL7*, *GAL10*), sacarose (gene *SUC2*, que codifica para a enzima invertase), e maltose (genes *MAL*, incluindo o gene *AGT1*), o que se fundamenta pela própria biologia comensal de *C. glabrata* em mamíferos, onde estes açúcares seriam dificilmente encontrados (DUJON et al, 2004; HITTINGER et al, 2004; WOLFE, 2006). Porém, resta uma dúvida, por que foram mantidas informações a respeito da utilização da trealose extracelular em seu genoma, se a trealose dificilmente é encontrada livre na natureza, e menos ainda no organismo de mamíferos?

Para tentar responder a esta pergunta, temos que recordar o papel da trealose e analisar as situações onde sua hidrólise parece ser essencial. A trealose é detectável em células de leveduras durante a fase logarítmica de crescimento, e seu acúmulo ocorre principalmente na fase estacionária, em esporos, ou durante situações de estresse. Recentes trabalhos indicam um papel fundamental deste açúcar no ciclo celular, onde a trealose seria estocada (juntamente com o glicogênio) na fase G1 do ciclo, e sua súbita quebra em moléculas de glicose dar-se-ia no final de G1, gerando assim uma quantidade grande de moléculas de glicose que proveriam a energia necessária para a divisão celular (TU et al., 2006; FUTCHER, 2006). De fato, este ciclo metabólico que se sobrepõe ao ciclo celular é acompanhado pela expressão cíclica das enzimas trealases (ácida e neutras), e concomitante a expressão de proteínas envolvidas na glicólise e na oxidação de ácidos graxos (TU et al., 2006). Entretanto, mutantes incapazes de sintetizar trealose e glicogênio foram capazes de crescer em condições limitantes de nutrientes, comprovando que estes carboidratos não são imprescindíveis para a progressão do ciclo celular, embora a capacidade de sobrevivência e a velocidade dos ciclos de divisão tenham sido maiores na cepa selvagem (SILLJÉ et al., 1999).

Além da função atribuída originalmente a trealose como carboidrato de reserva (LILLIE; PRINGLE, 1980), vários trabalhos comprovaram sua atuação como agente protetor celular ou estabilizante de proteínas em situações de estresse. Devido à estabilidade conferida às moléculas, provavelmente a trealose tenha sido selecionada pelas espécies para ser acumulada em resposta ao estresse. As células acumulam a

trealose em resposta a altas temperaturas e a outras condições adversas (desidratação, escassez de nutrientes, altas concentrações de etanol e sais, etc.). *In vitro*, a trealose é capaz de estabilizar proteínas nos seus estados nativos e preservar a integridade das membranas durante o estresse (CROWE et al., 1984). Entretanto, o papel da trealose é controverso, pois o dissacarídeo é degradado muito rapidamente após o estresse, apesar de seus efeitos estabilizantes sobre as proteínas (ATTFIELD, 1987; HOTTINGER et al., 1987). Em mutantes de *S. cerevisiae* que perderam o gene da trealase neutra (*nth1Δ*) (proteína responsável pela degradação intracelular da trealose), a trealose atinge altas concentrações, e ainda assim, a habilidade desses mutantes em recuperar-se após crescimento em altas temperaturas mostrou-se prejudicada (NWAKA et al., 1995). A explicação do por quê a degradação intracelular da trealose é requerida para uma eficiente recuperação das células parece ser que altas concentrações de trealose inibem a ação das chaperonas na recuperação de proteínas desnaturadas, além de inibirem, possivelmente, a atividade de outras enzimas necessárias para o metabolismo (SINGER; LINDQUIST, 1998; WERA et al., 1999; SAMPEDRO; URIBE, 2004).

Apesar de extensivamente estudada, a função da trealase ácida ainda não foi totalmente esclarecida. Além de mutantes *ath1* de *S. cerevisiae* estarem incapacitados de utilizar trealose extracelular, estes mutantes também apresentam incapacidade de crescer em glicerol por um mecanismo ainda não esclarecido (NWAKA et al. 1995; 1996; NWAKA, HOLZER, 1998). Por outro lado, foi também proposto que mutantes sem atividade trealase ácida apresentariam melhor performance fermentativa (KIM et al. 1996; SHIMA et al. 1999; JUNG, PARK, 2005), mas estes resultados tem sido contestados por outros autores (CHOPRA; SHARMA; GANESAN, 1999; vide PRONK, 2002).

Em outro trabalho recente, visando indentificar genes e/ou funções celulares necessários para a sobrevivência *in vivo* (no hospedeiro mamífero) de uma cepa patogênica de *S. cerevisiae*, verificou-se que mutantes incapazes de hidrolisar trealose eram menos patogênicos, e este fenótipo foi particularmente mais evidente em leveduras deletadas no gene da trealase ácida *ATH1* (KINGSBURY; GOLDSTEIN; McCUSKER, 2006). Portanto, a persistência desta enzima no genoma de *C. glabrata* talvez traga alguma “vantagem” competitiva para esta levedura, principalmente nas candidíases onde mais de uma espécie de *Candida* é encontrada. Associado ao

percentual significativo de isolados de *C. glabrata* que apresentam resistência aos antifúngicos azólicos, o extravasamento da trealose presente nas leveduras competidoras, sensíveis à droga durante o tratamento, tornaria o ambiente ao redor das células de *C. glabrata* abundante no dissacarídeo e, portanto, propício ao seu crescimento. Estas leveduras por possuírem elevada atividade trealase extracelular, seriam capazes de utilizar eficientemente este açúcar como fonte de carbono.

A necessidade de testes que façam o diagnóstico rápido e preciso de *C. glabrata*, principalmente em amostras de sangue, é justificada pela frequência de isolados resistentes aos antifúngicos azólicos e pela alta taxa de mortalidade associada a estas candidemias (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 1999; FREYDIERE et al., 2002; PEMAN et al., 2004). Entretanto, algumas desvantagens dos testes rápidos são relatadas, entre elas, a possível interferência do meio no qual as cepas foram isoladas. Provavelmente, esta interferência seja decorrente da repressão pela glicose excedente nestes meios sobre células testadas ou ainda, devido a não detecção da glicose gerada ocasionada pela falta de bloqueio da glicólise celular, o que poderia ser obtido com um tampão contendo fluoreto de sódio, por exemplo. Finalmente, cabe salientar que as enzimas do metabolismo da trealose em leveduras patogênicas são objeto de renovado interesse decorrente do provável envolvimento dessas enzimas na virulência, e sendo, portanto, consideradas alvos em potencial para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (ECK et al., 1997, ZARAGOZA; BLASQUEZ; GANCEDO, 1998; ZARAGOZA et al., 2002, VAN DIJCK ET AL., 2002). Certamente que a metabolização de trealose por *C. glabrata* merece um maior aprofundamento, e que os resultados aqui apresentados constituem uma caracterização inicial da utilização deste açúcar por este patógeno emergente. Acreditamos que nossos resultados poderão ser úteis em melhorias no diagnóstico diferencial desta levedura, além de identificar potenciais alvos terapêuticos para a elaboração de novos fármacos.

VI CONCLUSÃO

No presente trabalho, analisamos o catabolismo da trealose extracelular na levedura *C. glabrata* e caracterizamos bioquimicamente sua trealase ácida. *C. glabrata* tem sido apontada com a segunda espécie mais comumente envolvida na etiologia das infecções por *Candida*. Devido a sua frequência nos isolados clínicos e à reduzida sensibilidade aos antifúngicos azólicos no final dos anos 90, vários testes rápidos foram desenvolvidos prometendo uma identificação rápida e presuntiva de *C. glabrata*. Estes testes têm como princípio a habilidade desta levedura em utilizar eficientemente a trealose como fonte de carbono, hidrolisando de forma rápida as moléculas de trealose em duas de glicose. No entanto, não há relato científico desta observação prática.

De fato, comprovamos a capacidade de *C. glabrata* em fermentar a trealose. A levedura, após consumir a trealose disponível no meio, atingiu elevadas densidades celulares e produziu expressiva quantidade de etanol. *C. glabrata* mostrou-se capaz de fermentar a trealose tão bem quanto a glicose. Nossos resultados mostraram que o pH ótimo da enzima trealase presente na superfície das células de *C. glabrata* é de 4,4. Além disso, constatamos na fase exponencial de crescimento, acúmulo de 2,5 g/L de glicose no meio, sugerindo a hidrólise extracelular deste dissacarídeo.

Constatamos também que a trealase ácida de *C. glabrata* é secretada para o meio de cultura. Esta enzima é sintetizada durante o crescimento em trealose sem que, no entanto, a trealose seja seu indutor, já que, alta atividade enzimática também foi detectada após crescimento da levedura em glicerol e durante a desrepressão das células após consumo de glicose. A trealase secretada para o meio possui massa molecular de 275 kDa na sua forma ativa. Entretanto, a análise de proteínas através de SDS-PAGE revelou uma proteína com massa molecular de aproximadamente 130 kDa (valor coincidente com o peso teórico da enzima), sugerindo que a proteína ativa seja um dímero.

A trealase semipurificada do sobrenadante de cultivo através da filtração em gel, apresentou alta especificidade e afinidade pela trealose, com valores de K_m e V_{max} de 3,4 mM e 80 U(mg de proteína)⁻¹, respectivamente. Além da provável natureza glicoproteica devido à afinidade observada pela concanavalina A.

Pretendemos dar continuidade a este trabalho e, através de modificações no protocolo de transformação, obter cepa de *C. glabrata* delatada no gene da trealase

ácida. Várias são nossas perspectivas de investigações com este mutante: comprovar a dependência desta enzima para o catabolismo da trealose extracelular por esta levedura; seu provável papel na hidrólise da trealose endógena; ou ainda avaliar se esta mutação implicaria em perda da patogenicidade ou virulência.

Nossas descobertas além de possibilitarem o aprimoramento dos testes rápidos laboratoriais, abrem portas para demais pesquisas sobre a expressão, localização e provável via de excreção desta enzima em *C. glabrata* e em outras espécies de *Candida*. Assim como instiga a investigação sobre o possível papel da trealase ácida na interação de *C. glabrata* com o hospedeiro *in vivo* ou de *C. glabrata* com *C. albicans* *in vitro*. E, já que *C. glabrata* comumente apresenta resistência à terapia convencional, a trealase ácida, por ser extracelular e aparentemente essencial para a sobrevivência desta levedura, poderia ser um alvo potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

VI REFERÊNCIAS

- ALIZADEH, P.; KLIONSKY, D. J. Purification and biochemical characterization the ATH1 gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 391, p. 273-278, 1996.
- ALMEIDA, F. M.; LUCIO, A. K. B.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H. F. Function and regulation of the acid and neutral trehalases of *Mucor rouxii*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.155, p.73-77, 1997.
- ALMIRANTE, B. et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of candida bloodstream infection: results from population- based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p.1829-1835, 2005.
- ALVAREZ-PENAL, F. J.; ARGÜELLES, J. Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 837-843, 2000.
- AMARAL, F.C. et al. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. **Arch. Microbiol.**, v. 167, p. 202-208, 1997.
- AQUINO, A. C. M. M. et al. Characterization of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunichemical localisation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 169-175, 2005.
- ARAUJO, P.S.; PANEK, A.C.; FERREIRA, R.; PANEK, A.D. Determination of trehalose in biological samples a simple and stable trehalose preparation. **Anal. Biochem.**, v.176, p. 432-436, 1989.
- ARGUELLES, J.C. Physiological role of trealose in bacteria and yeast: a comparative analysis. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p. 217-24, 2000.
- ARGUELLES, J.C.; GACTO, M. Evidence of regulatory trehalase activity in *Candida utilis*. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p. 529-537, 1985.
- ATTFIELD, P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Lett.**, v. 225, p.259-63, 1987.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. Greene Publishing Associates, Jonh Wiley & Sons. NY, 1995.
- AZOULAY, E. M. D. et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent Pseudomonas ventilator-associated pneumonia. **CHEST**, v.129, p. 110-17, 2006.

- BADDLEY, J.W.; SMITH, A.M.; MOSER, S.A.; PAPPAS, P. G. Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a University Hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, p. 199-201, 2001.
- BASU, A. et al. Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1760, p. 134-140, 2005.
- BATEMAN, A. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 138-41, 2004.
- BELL, W., SUN, W.; HOHMANN, S.; WERA, S.; REINDERS, A.; DE VIRGILIO, C. WIEMKEN, A.; THEVELEIN, J. M. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 33311-19, 1998.
- BHARADWAJ, G.; MAHESHWARI, R. A comparison of thermal characteristics and kinetic parameters of trehalases from a thermophilic and mesophilic fungus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 187-193, 1999.
- BISWAS, N.; GHOSH, A. K. Characterisation of an acid trehalase of *Saccharomyces cerevisiae* present in trehalase-sucrase aggregate. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1290, p.95-100,1996.
- BISWAS, N.; GHOSH, A. K. Regulation of acid trehalase activity by association–dissociation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1379, p. 245-56, 1998.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 81, p. 93-99, 1987.
- BODEY G. P. et al. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, v. 112, p. 380-385, 2002.
- BOLDO, X. M. et al. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. **J. Clin. Microbol.**, v.41, p. 4799-4804, 2003 .
- BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUN, S. et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1788-1796, 2004.
- BRUN, S. et al. Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungal in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agent. Chemother.**, v. 47, p.847-853, 2003.

- CARDELLO, L.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. A cytosolic trehalase from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Microbiol.**, v. 140, p. 1671-1677, 1994.
- CANUTO, M. M. et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strain in HIV-infected patient. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 593-601, 2002.
- CARTLEDGE, J. D., MIDGLEY, J., GAZZARD, B. G. Non-albicans oral candidosis in HIV-positive patients. **J. Antimicrob. Chemotherapy.**, v. 43, p.419-422, 1999.
- CATAÑO, I., et al. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. **Mol. Microbiol.**, v.55, p.1246-1258, 2005.
- CELENZA, J. L.; CARLSON, M. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p.5034-5044, 1989.
- CERRUTTI, P. et al. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 575-80, 2000.
- CHEN, Y. C. et al. Identification of medically important yeast using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2302-10, 2000.
- CHOPRA R.; SHARMA V. M; GANESAN K. Elevated growth of *Saccharomyces cerevisiae* ATH1 null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2267-8, 1999.
- COLAÇO, C.; SEN, S.; THANGEVALU, M.; PINDER, S. ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnol.**, v. 10, p. 1007-1011, 1992.
- COLOMBO, A. L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUCIPANACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p.470-474, 2003.
- CORMACK, B.P., GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v.285, p. 578-582,1999.
- CORSELLO, S. et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.93, n.2, p.141-145, 2003.
- COUTINHO, C. et al. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. **J. Biotechnol.**, v.7, p. 23-32, 1988.

- CROWE, L. M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J. M., JACKSON, S. A.; WOMERSLEY, C. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 769, p. 141-150, 1984.
- DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 29, p 1-24, 2003.
- DE LAS PENAS, A et al., Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. **Gene & Development.**, v. 17, p. 2245-58, 2003.
- DE MEEUS, T. et.al. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2199-206, 2002.
- DE VIRGILIO, C.; BÜRCKERT, N.; BELL, W.; JENA, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 212, p. 315-323, 1993.
- DEKKER, R. F. H. et al. Screening for microbial trehalases: extracellular trhalases produced by *Fusarium* species. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 13, p. 73-79, 1997.
- D'ENFERT, C.; FONTAINE, T. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* treA encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 203-216, 1997.
- D'ENFERT, C. et al. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in filamentous fungi *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 471-481, 1999.
- DESTRUELLE, M.; HOLZER, H.; KLIONSKY, D. J. Identification and characterization of a novel yeast gene: the YGP1 gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, p. 2740-54, 1994.
- DESTRUELLE, M.; HOLZER, H.; KLIONSKY, D. J. Isolation and characterization of novel yeast gene, ATH1, which required for vacuolar acid trehalase activity. **Yeast**, v.11, p. 1015-25, 1995.
- DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolated in North America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 20, p. 412-418, 2002.

- DODGSON, A. R. et al. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p.5709–17, 2003.
- DOMERGUE, F. et al. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. **Science**, v. 308, p. 866-70, 2005 .
- DUJON, B. et al. Genome evolution in yeast. **Nature**, v. 430, p. 35-44, 2004.
- ECK, R. et al. A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. **Microbiol.**, v. 143, p. 3747-3756, 1997.
- EDMOND, M.B. et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospital: a three-year analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 239-244, 1999.
- EDWARDS, J. E. J. Invasive candida infections. Evolution of a fungal pathogen. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1060-2, 1991.
- EIS, C. et al. Fungal trehalose phosphorylase: kinetic mechanism, pH-dependence of the reaction and some structural properties of the enzyme from *Schizophyllum commune*. **Biochem. J.** , v. 356, p.757-67, 2001.
- ELBEIN, A. D. The metabolism of α,α -trehalose. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 30, p. 227-256, 1974.
- ELBEIN, A. D. et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiol.**, v. 13, p. 17-27, 2003.
- ELEUTHERIO, E. C. A.; DE ARAUJO, P. S. AND PANEK, A. D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1156, p. 263-266, 1993.
- ERGON, M. C.; GULAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at anintensivecareunit. **Mycoses**, v. 48, p. 126-31, 2005.
- ESMON, P. C. et al. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p.4387-94, 1997.
- FIDEL, P. L.; VASQUES, J. A.; SOBEL J. D. *Candida glabrata*, review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 80-96, 1999.
- FISHER, G. et al. Highly Variable Rates of Genome Rearrangements between Hemiascomycetous Yeast Lineages. **PLoS Genet.**, v.2, p. e32, 2006.
- FOSTER, A. J.; JENKINSON, J. M.; TALBOT, N. J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Megnaporthe grisea*. **EMBO J.**, v. 23, p.235, 2003.

- FOULET, F. et al. Microsatellite Marker Analysis as a Typing System for *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 4574–79, 2005.
- FUTCHER, B. Metabolic cycle, cell cycle, and the finishing kick to start. **Genome Biology**, v. 7, article 107, p. 1-5, 2006.
- FREYDIERE, A. M.; PARANT, F.; NOEL-BARON, F.; CREPY, M.; TRENZY, A.; RABERIN, H.; DAVIDSON, A.; ODDS, F.C. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3602-5, 2002.
- FREYDIERE, A. M.; ROBERT, R.; PLOTON, C.; MAROT-LEBLOND, A.; MONERAU, F.; VANDENESCH, F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test GLABRATA RTT. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 3861-3, 2003.
- GANCEDO, C.; FLORES, C. L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. Mini Review. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 351-359, 2004.
- GHANNOUM, M. A. et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 43, p. 641-8, 2000.
- GOLDSTEIN, A. L.; PAN, X.; McCUSKER, J. H. Heterogenous URA 3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 507-511, 1999.
- GOSWAMI, R. et al. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. **J. Infect.**, v. 41, p.162-1622, 2000.
- HALME, A. et al. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. **Cell**, v. 116, p. 406-15, 2004.
- HECKER, L. I.; SUSSMAN, A. S. Localization of trehalase in the ascospores of *Neurospora*: relation to ascospore dormancy and germination. **J. Bacteriol.**, v.115, p.592-599, 1973.
- HENRY, K. W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2693-700, 2000.
- HERWIG, C. et al. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.76, p.247-58, 2001.
- HINO A.; MIHARA, K.; NAKASHIMA, K.; TAKANO, K. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 1386-91, 1990.

- HITCHCOCK, C. A., et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1962-1965, 1993.
- HITTINGER, C. T.; ROKAS, A.; CAROL, S. B. Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 14144-9, 2004.
- HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 5518-5522, 1987.
- JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. THEVELEIN, J. M.; TERENCEZI, H. F. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 154, p. 165-171, 1997.
- JULES, M. et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.2771-78, 2004.
- JUNG, Y; PARK, H. Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH, 2005) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, p. 1855-1859, 2005.
- KAMIYA, A. et al. Epidemiological study of *Candida* species in cutaneous candidiasis based on PCR using a primer mix specific for the DNA topoisomerase II gene. **J. Dermatol. Science**, v.37, p. 21-28, 2005.
- KAUR, R.; CASTANO, I; CORMACK, B. P. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1600-13, 2004.
- KAUR, R. et al. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 378-84, 2005.
- KIM, J. et al. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p.1563-9, 1996.
- KINGSBURY, J. M.; GOLDSTEIN, A. L.; McCUSKER, J.H. Role of nitrogen and carbon transport, regulation, and metabolism genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo. **Eukaryotic Cell.**, v. 5, p. 816-824, 2006.
- KITCH, T.T.; MICHAEL, L.R.; MCGINNIS, M.R.; APPELBAUM, P.C. Ability of RapID Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeast within 5 hours. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1069-71, 1996.
- KNOP, M. et al. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. **Yeast**. v.15, p. 963-72, 1999.
- KADOWAKI, et al. Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1291, p. 199-205, 1996.

- KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 255-67, 2004.
- KOPP, M., MÜLLER, H.; HOLZER, H. Molecular analysis of neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 4766-4774, 1993.
- KOSZUL, R. et al. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (torulopsis) glabrata*. **FEBS Lett.**, v.534, p. 39-48, 2003.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico, 8ª. Ed. São Paulo: Sarvier, p. 174-182, 1991.
- LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **J. Bacteriol.**, v. 143, P. 1384-94, 1980.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 56, p. 658-666, 1934
- LOEFFLER, J. et al. Development and evaluation of the nuclisens basic kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. **Diagno. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 45, p. 217-20, 2003.
- LONDESBOROUGH, J. ; VARIMO, K. Characterization of two trehalases in baker's yeast. **Biochem. J.**, v. 219, p. 511-518, 1984.
- LONGTINE, M. S. et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.**, v.14, p. 953-61, 1998.
- LOPEZ, J.; DALLE, F.; MANTELIN, P.; MOIROUX, P.; NIERLICH, A.P.; CUISENIER, B.; VAGNER, O.; BONNIN, A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1172-4, 2001.
- LOPEZGALLARDO, Y. et al. Membrane-associated trehalase activity in *Phycomyces blakesleeanus* spores. **Mycological Res.**, v. 99, p. 1317-20, 1995.
- LUCIO, A. K. B.; POLIZELI, M. L.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F. Stimulation of hyphal growth in anaerobic cultures of *Mucor rouxii* by extra cellular trehalose. Relevance of cell wall-bound activity acid trehalase for trehalose utilization. **FEMS Lett.**, v.182, p.9-13, 2000.
- LUNDSTRO M., T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria: a review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1602-7, 2001.

- LYON, J. P. et al. Predisposing conditions for *Candida spp.* carriage in the oral cavity of denture wearer sand individuals with natural teeth. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 462-7, 2006.
- MALUTTA, E. F.; DECKER, P.; STAMBUK, B.U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.**, v. 40, p. 199-205, 2000.
- MANSURE, J.J.; SILVA, J.T.; PANEK, A. D. Characterization of trehalase in *Rhodotorula rubra*. **Biochem. Int.**, v. 28, p. 693-700, 1992
- MANSURE, J. J. C.; PANEK, A. D.; CROWE, L. M.; CROWE, J. H. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1191, p. 309-316, 1994.
- McMULLAN, R. et al. Trends in the epidemiology of *Candida* bloodstream infections in Northern Ireland between january 1984 and december 2000. **J. Infect.**,v. 45, p. 25-28, 2002.
- MELO, N. R. et al. Oral *Candida* flora from brazilian human immunodeficiency virus-infected patient in the highly active antiretroviral therapy era. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 4, p. 425-431, 2004.
- MITTENBUHLER, K.; HOLZER, H. Characterization of different forms of yeast acid trehalase in the secretory pathway. **Arch. Microbiol.** v. 155, p.217-20, 1991.
- MITTERNBÜHLER, K.; HOLZER, H. Purification and characterization of acid trehalases from the *suc2* mutant. **J. Biol. Chem.** , v. 263, p.8537-43, 1988.
- MIYAZAKI, Y. et al. Fluconazole resistance associated with drug effluxo and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1695-1701, 1998.
- MORSCHHAUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Gene**, v. 236, p.43-51, 2002.
- MOURET, J. R.; JACOBSEN, J. N.; GUILLOUET, S. E. Kinetic analysis of a trehalase-overexpressing strain grown on trehalose: a new tool for respiro-fermentative transition studies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.42, p. 363-8, 2006.
- MURRAY, M.P.; ZINCHUK, R.; LARONE, D.H. CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeast and as a source medium for the Rapid-Assimilation-of Trehalose Test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p.1210-12, 2005.
- NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol.**, v.6, p. 915-26, 2004.
- NWAKA, S. et al. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 360, p. 286-290, 1995.

- NWAKA, S.; MECHLER, B.; HOLZER, H. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Lett.**, v. 386, p. 235-238, 1996.
- NWAKA S, HOLZER H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**, v. 58, p. 197-237, 1998.
- OLIVEIRA, R. D. R., MAFFEI, C. M. L., MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.47, n.3, p. 231-235, 2001.
- PANACKAL, A. A. et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1740-3, 2006.
- PARROU, J. L.; JULES, M.; BELTRAN, G., FRANÇOIS, J. Acid trehalase in yeast and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. **FEMS Yeast Res.**, v.5, p. 503-511, 2005.
- PEDREÑO, Y. et al. The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40852-40860, 2004.
- PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SCHNITZLER, N.; LUTTICKEN, R.; HAASE G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 202-5, 1999.
- PEMÁN, J. et.al. Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21, p.82-84, 2004.
- PERSON, B. M.; HERNANDO, Y.; SCHWEIZER, M. Construction of PCR-ligated long flanking homology cassettes for use in the functional analysis of six unknown open reading frames from the left and right arms of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. **Yeast**, v. 14, p. 391-399, 1998.
- PETTER, R.; KWON-CHUNG, K. J. Disruption of the SNIF1 gene abolishes trehalose utilization in pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5269-73, 1996.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M. B. AND WENZEL R. P. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagno. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, p. 327-332, 1998.
- PFALLER, M. A.; DIECKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. AND THE SENTRY PARTICIPANT GROUP. International surveillance of blood stream infection due to *Candida* species: frequency of occurrence in vitro susceptibility to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 though 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3254-3259, 2001.

- PFALLER, M.A. et al. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 3142-3146, 2003.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 11-23, 2004.
- PRICE, M.F.; LA ROCCO, M.T.; GENTRY, L.O. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 1422-4, 1994.
- PRONK, J. T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2095-100, 2002.
- RAM, S.P. et al., Exo-(1-3)-beta-glucanase, autolysin and trehalase activities during yeast growth and germ-tube formation in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 130, p. 1227-36, 1984.
- REDDING, S. W. et al. *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n.1, p. 47-52, 2004.
- RICHTER, S. S. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n.5, p. 2155-2162, 2005.
- RIBEIRO, M.A. et al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathol.**, v.151, p.5-10, 2000.
- RINALDI, W. G.; WINGARD, J. R.; MERZ, M.G.; MILLER, C. B.; KARP, J. E.; SARAL, R. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patient. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1847-1849, 1993.
- ROLIM, M. F. et al. Shared control of maltose and trehalose utilization in *Candida utilis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 839-837, 2003.
- ROSER B. J. Trehalose, a new approach to premium dried foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 2, p. 166-169, 1991.
- ROY, A.; GHOSH, A. K. Correlation between stationary phase survival and acid trehalase activity in yeast. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1401, p. 235-8, 1998.
- ROY, A. et al. Acid trehalase deficiency and extracellular trehalose utilization in *Candida utilis*. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.737-729, 2001.

- RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. **Curr. Drug. Targets.**, v. 7, p. 495-504, 2006.
- RUSCHE, L.N.; KIRCHMAIER, A. L.; RINE, J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 481-516, 2003.
- SALGADO, A.M.; FOLLY, R.O.M.; VALDMAN, B.; COS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for determination of ethanol by injection analysis. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 237-330, 2000.
- SAMPEDRO, J. G.; URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 256/257, p. 319-327, 2004.
- SAN MIGUEL, P.F.; ARGUELLES, J.C. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1200, p. 155-160, 1994.
- SANGLANRD, D.; ISCHER, F.; BILLE, J. Role of the ATP-binding-cassete transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p.1174-1183, 2001.
- SANO, F. et al. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. **Cryobiol.**, v. 39, p. 80-7, 1999.
- SANSON, G. F.O.; BRIONES, M. R. S. Typing of *Candida glabrata* in clinical isolates by comparative sequence analysis of the cytochrome c oxidase subunit 2 gene distinguishes two clusters os strains associated with geographical sequence polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**,v.38, n.1, p. 227-235, 2000.
- SCANNEL, D. R. et al. Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. **Nature.**, v. 440, P. 341-5, 2006.
- SCHICK, I. HALTRICH, D., KULBE, K.B. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.43, p. 1088-1095, 1995.
- SENDID, B. et al. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 80, 2006.
- SHIMA, J. et al. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial Baker's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2841-6, 1999.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.76-89, 1999.
- SILLJÉ, H. H. W. et al. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 396-400, 1999.

- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermo tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Tibtech. Rev.**, v. 16, p. 460-8, 1998.
- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Mol. Cell.**, v. 1, p. 639-48, 1998b.
- SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Anal. Biochem.**, v. 238, p. 26-28, 1996.
- SMALL, C.L.; DONALDSON, N.; BIDOCHKA, M. J. Nucleotide sequence variation does not relate to differences in kinetic properties of neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 428-34, 2004.
- SOBEL, J. D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J. Obstet. Gynecol.**, v. 178, p. 203-211, 1998.
- SOBEL, J. D. et al. Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucitocina. **Am J. Obstet Gynecol**, v. 189, p.1297-1300, 2003.
- SOTO, T. et al. Analysis of the ntp1 gene, encoding neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1443, p. 225-229, 1998.
- STAMBUK, B. U.; CROWE, J.H., CROWE, L.M., PANEK, A.D.; DE ARAUJO, P.S. A dependable method for the synthesis of [¹⁴C]trehalose. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 150-153, 1993.
- STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D.; SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 876-881, 1996.
- STAMBUK, B.U., PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1379, p.118-128, 1998.
- STAMBUK, B.U.; ARAUJO, P.S. Kinetics of active α -glycoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 1, p. 73-78, 2001.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi. **Exp. Mycol.**, v.12, p.1-12, 1988.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p.42-59, 1984.
- THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem. Sci.**, v.20, p.3-10, 1995.

- TRAMA, J. P.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M.E. Detection and identification of *Candida* species associated with candida vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. **Mol. Cell. Probes**, v. 19, p. 145-152, 2005.
- TSAI, H. F. et al. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, p.1384-92, 2006.
- TU, B. P. et al. Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. **Science**, v. 310, p.1152-58, 2006.
- VALERIO, H. M., WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. , RESENDE, M.A., Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 174-8, 2006.
- VAN DIJCK, P.; DE ROP L.; SZLUFCHIK, K.; VAN AEL, E.; THEVELEIN, J.M. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 1772-1782, 2002.
- VAZQUEZ, J. A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n. 2, p.421-426,1998.
- VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcriptionfactor. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 3773-81, 2004.
- VERSTREPEN, K. J.; REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 533-40, 2004.
- VERSTREPEN, K. J. et al. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 986-90, 2005.
- VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol.**, v. 60, p. 5-15, 2006.
- WENJIN, Q.; YIFU, S. Epidemiological study on vaginal *Candida glabrata* isolated from pregnantwomen. **Scand. J. Infect. Dis.**,v. 38, p. 49-54, 2006.
- WERA, S. et al. Opposite roles of trehalose activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 343, p. 621-26, 1999.
- WHITEWAY, M.; OBERHOLZER, U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 350-7, 2004.
- WILLIAMS, C. F. ; NIEDERPRUEM, D. J. Trehalase in *Schizophyllum commune*. **Arch. Microbiol.**, v. 60, p. 377-383, 1968.

- WINKLER, K. et al. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. **FEBS Lett.**, v. 291, p.269-272, 1991.
- WISSER, G. et al. Identification and characterization of an extracellular acid trehalase from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **New Phytologist.**, v.146, p.169-175, 2000.
- WOLFE, K. H. Comparative genomics and genome evolution in yeasts. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, p.403-12, 2006.
- YANG, Y. et al. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, Art. no. 99, 2005.
- XIA, Y.; CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A. K. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 80, p. 139-47, 2002.
- XIA, Y. et al. Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 80, p. 127-32, 2002.
- XY, H. et al. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, v. 49, p. 80-4, 2006.
- ZARAGOZA, O.; BLAZQUES, M.A.; GANCEDO, C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hypha and decreases infectivity. **J. Bacteriol.**, v.180, p. 3809-3815, 1998.
- ZARAGOZA, O. et al. Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. **Microbiol.**, v.148, p.1281-1290, 2002.
- ZIMMERMANN, A. L. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1036, p. 41-446, 1990.

ANEXO A – Identificação das principais leveduras de interesse clínico

Quadro 9.1. Identificação das principais leveduras de interesse clínico

LEVEDURAS	Assimilação												Fermentação										U	KNO ₃	
	Inu	Ram	Ara	Gll	Sac	Lac	Gal	Raf	Ino	Xil	Cel	Tre	Dul	Mal	Mel	Gll	Sac	Lac	Gal	Tre	Mal	Cap			Tg
<i>Candida albicans</i>	NT	NT	NT	+	V	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	G	-	-	V	G	G	-	+		
<i>C. guilliermondii</i>	-	NT	NT	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	G	G	-	-	V	G	-	-		
<i>C. krusei</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	V	-		
<i>C. parapsilosis</i>	-	NT	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	V	-	-	-	V	-	-	-		
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	NT	NT	+	+	+	V	+	-	V	V	V	-	V	-	G	G	G	-	-	-	-	-		
<i>C. stellatoidea</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	G	-	-	-	-	G	-	+		
<i>C. tropicalis</i>	NT	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V	+	-	+	-	V	V	-	-	G	G	-	-		
<i>C. zeylanoides</i>	NT	NT	NT	+	-	-	V	-	-	-	V	+	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	-		
<i>C. lambica</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	V	-		
<i>C. lipolytica</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+		
<i>C. lusitanae</i>	NT	+	NT	+	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	-	G	V	-	-	V	-	-	-		
<i>C. rugosa</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>C. famata</i>	NT	NT	NT	+	V	V	+	-	-	V	V	+	-	+	V	V	-	-	-	G	V	-	-		
<i>C. glabrata</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	V	+	+	V	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. albidus</i>	NT	NT	NT	+	+	V	V	V	V	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	V	+		
<i>C. gastricus</i>	NT	NT	NT	+	V	V	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. laurentii</i>	NT	NT	NT	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. terreus</i>	NT	NT	NT	+	-	V	V	-	+	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. luteolus</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. unguiculatus</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	V	+	+	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>Rhodotorula rubra</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	+		
<i>R. glutinis</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	V	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	+		
<i>Trichosporon inkkii</i>	-	-	V	+	+	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>T. ovoides</i>	-	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	V	+	+	+	V	+	+	-	G	G	-	-	G	V	-	-		
<i>Geotrichum candidum</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>G. capitatum</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Hansenula anomala</i>	NT	-	NT	+	+	-	V	V	-	V	+	+	-	+	-	G	G	-	-	V	V	-	+		

NT = não testado; G = produção de gás; + = positivo; - = negativo; V = variável; Inu = inulina; Iru = inulina; Ram = L-ramnose; Ara = L-arabinose; Gll = glicose; Sac = sacarose; Lac = lactose; Gal = D-galactose; Raf = rafinose; Ino = inositol; Xil = D-xilose; Cel = celobiose; Tre = trealose; Dul = dulcitol; Mal = maltose; Mel = melibiose; Cap = capsulita; Tg = tubo germinativo; U = urease; KNO₃ = nitrato de potássio.