

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

Ludmila Mascarenhas Barros

**METABOLISMO DE TREALOSE E CARACTERIZAÇÃO DE
TREALASES CITOPLASMÁTICAS EM *CANDIDA GLABRATA***

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Bioquímica.
Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B277m Barros, Ludmila Mascarenhas
Metabolismo de trealose e caracterização de trealases
citoplasmáticas em *Candida glabrata* [dissertação] / Ludmila
Mascarenhas Barros ; orientador, Boris Juan Carlos Ugarte
Stambuk. - Florianópolis, SC, 2011.
65 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. *Candida glabrata*. 3. Trealase. 4.
Trealose. 5. Metabolismo. I. Stambuk, Boris Juan Carlos
Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

Ludmila Mascarenhas Barros

**METABOLISMO DE TREALOSE E CARACTERIZAÇÃO DE
TREALASES CITOPLASMÁTICAS EM *CANDIDA GLABRATA***

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr.
Marcelo Farina
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Nelson Horácio Gabilan
Universidade Federal de Santa Catarina
(Suplente)

Dedico esta dissertação a Deus, meus pais, e meu orientador.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, dona Maria e meu pai, seu João, à vovó Maria e tia Maria do Carmo, Gu pelo apoio emocional e força.

Ao meu orientador, Professor Boris Stambuk, pela orientação, partilha de conhecimentos, com dedicação e paciência durante todo este percurso: desde a criação do projeto à elaboração final da dissertação, participando de todas as etapas com atenção e profissionalismo.

Às meninas e meninos do laboratório (especialmente Catarina e Débora) pelo apoio técnico e apoio pessoal.

Ao Dr. Vilela pelo apoio psicológico.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFSC, especialmente aos professores Carlos Peres (e seu orientando Daniel), Marcelo Farina, Fátima, Rodrigo, Nelson, e Hernán Terenzi, pela atenção, dedicação no percurso da minha caminhada neste programa de pós-graduação: pelas consultorias, apoio como docentes, paciência, empréstimos de equipamentos e reagentes.

Ao programa de bolsas CAPES-REUNI, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela concessão (parcial, um ano) de bolsa de estudos.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

“O que os israelitas recolhiam eram os casulos de besouros parasitas: Trehala manna, do qual originou o nome trealose, é o que explica a fala de Moisés, alertando seu povo para não guardá-los: ‘Alguns, no entanto, não deram ouvidos... ficaram cheios de vermes e fediam’. Os casulos, em espinheiras localizadas do Oriente Médio eram altamente nutritivos, consistindo em 30% de trealose mais proteínas”. (John Emsley, 1996, sobre o maná).

RESUMO

Candida glabrata é uma levedura encontrada normalmente no trato digestivo humano e mucosas humanas, mas em pacientes imunocomprometidos pode causar infecções sistêmicas de alta morbidade e mortalidade. Esta levedura perdeu vários genes envolvidos no metabolismo de açúcares, sendo capaz de assimilar somente glicose e trealose, uma característica importante no diagnóstico laboratorial deste patógeno emergente. Nosso trabalho se propôs a analisar o metabolismo da trealose, e as enzimas intracelulares (trealase neutra e trealase ácida) envolvidas na degradação deste açúcar. Nossos resultados indicam que embora *C. glabrata* metabolize a trealose de forma semelhante a outras leveduras (a trealose acumulada na fase estacionária do crescimento é prontamente degradada após suprir as células com glicose), a atividade da trealase neutra nestas células aparentemente não seria responsável pela degradação da trealose uma vez que sua atividade não aumentava no período de maior hidrólise deste açúcar. Nossos resultados também mostram que a alta atividade da trealase ácida presente nas células de *C. glabrata*, atrapalha a determinação da trealase neutra nestas células (baseado apenas na diferença de pH ótimo da atividade). Neste contexto a utilização de uma linhagem (RY01) deletada no gene *CgATH1*, e portanto sem atividade trealase ácida, foi fundamental para melhor caracterizar a atividade trealase neutra nesta levedura, e sua possível regulação. Esta enzima não mostrou maior atividade na fase exponencial do crescimento quando a glicose está presente como fonte de carbono, nem ativação por AMPc via proteína cinase A, embora os resultados indiquem que a trealase neutra de *C. glabrata* degrada trealose na fase exponencial, pois na cepa deletada RY01 observou-se um queda brusca nos níveis de trealose durante esta fase do crescimento. Diferenças significativas foram também observadas na metabolização de trealose durante o estresse térmico em *C. glabrata*, quando comparada a outras leveduras.

Palavras-chave: *Candida glabrata*. Trealase. Trealose. Metabolismo.

ABSTRACT

Candida glabrata is a yeast normally found in the human digestive tract and mucous membranes, but in immunocompromised patients can cause systemic infections with high morbidity and mortality. This yeast has lost many genes involved in sugar metabolism, being able to assimilate only glucose and trehalose, an important feature in the laboratory diagnosis of this emerging pathogen. Our study aimed to analyze the metabolism of trehalose, and the intracellular enzymes (neutral trehalase and acid trehalase) involved in its hydrolysis. Our results indicate that although *C. glabrata* metabolizes trehalose in a similar way as other yeasts (trehalose accumulated during the stationary phase of growth is rapidly hydrolyzed after supplying the cells with glucose), the neutral trehalase activity in these cells seemed not to be involved in trehalose degradation as its activity did not increase during the period of higher sugar hydrolysis. Our results also show that the high activity of the acid trehalase present in *C. glabrata* cells, impairs the accurate determination of the neutral trehalase in these cells (based only on optimal pH activity differences). In this context, the use of a strain (RY01) deleted in the *CgATH1* gene, and consequently without acid trehalase activity, was pivotal to better characterize the neutral trehalase activity in these cells, and its possible regulation. This enzyme did not show higher activity during the exponential phase of growth when glucose is present as carbon source, neither AMPc activation through protein kinase A, although our results indicate that the *C. glabrata* neutral trehalase hydrolyses trehalose during the exponential phase, since in the RY01 deleted strain a rapid drop in trehalose levels during this growth phase was observed. Significant differences were also observed in trehalose metabolism during heat stress in *C. glabrata*, when compared with other yeasts.

Keywords: *Candida glabrata*. Trehalase. Trehalose. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Mecanismos de resistência a antibióticos em leveduras.....	19
Figura 1.2 Filogenia da <i>Candida glabrata</i> com outras leveduras baseada na sequência do RNA 18S.....	20
Figura 1.3 Estrutura da trealose.....	22
Figura 1.4 Trealose e renovelamento de proteínas por chaperonas após choque térmico.....	23
Figura 1.5 Proteção de membranas pela trealose na desidratação	24
Figura 1.6 Via de sinalização mediada pela PKA/AMPC em <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 4.1 Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% de glicose pela cepa LEM1 8228 de <i>C. glabrata</i>	36
Figura 4.2 Atividade trealase durante o crescimento em 2% de glicose por células da cepa LEM1 8228 de <i>C. glabrata</i>	37
Figura 4.3 Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% glicose pela cepa Bg14 de <i>C. glabrata</i>	38
Figura 4.4 Atividade trealase durante o crescimento em 2% glicose por células da cepa Bg14 de <i>C. glabrata</i>	39
Figura 4.5 Hidrólise de trealose em função do pH pela linhagem Bg14 de <i>C. glabrata</i>	41
Figura 4.6 Zimograma mostrando a determinação da atividade trealase após separação das proteínas em gel de poliacrilamida	42
Figura 4.7 Hidrólise de trealose em função do pH pela linhagem RY01 de <i>C. glabrata</i>	44
Figura 4.8 Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% glicose pela cepa RY01 de <i>C. glabrata</i>	45
Figura 4.9 Atividade trealase durante o crescimento em 2% glicose por células da cepa RY01 de <i>C. glabrata</i>	46
Figura 4.10 Ativação da atividade trealase in vivo por glicose.....	48
Figura 4.11 Níveis de trealose intracelular durante o choque térmico na linhagem Bg14 de <i>C. glabrata</i>	50
Figura 4.12 Níveis de trealose intracelular durante o choque térmico na linhagem RY01 de <i>C. glabrata</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Linhagens de leveduras analisadas.....	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Adenosina 5' trifosfato

BSA- Albumina de soro bovino

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenomdiaminotretácetico

HEPES – Ácido-4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfônico

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

YPD – Yeast Peptone Dextrose

MtDNA – DNA mitocondrial

MOPS – Ácido morfolinopropanosulfônico

ORF– Open reading frame (Fase de leitura aberta)

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

PKA – Proteína Cinase A

T6F – Trealose-6-fosfato

Tris – tris (hidroximetil)aminometano

UDP-glicose – Uridina difosfato glicose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O gênero <i>Candida</i> ssp.....	15
1.2 <i>Candida glabrata</i>	15
1.3 Metabolismo de trealose.....	21
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Cepas de leveduras estudadas.....	31
3.2 Meio e Condições de Cultivo.....	31
3.3 Obtenção de extratos celulares.....	32
3.4 Extração de trealose.....	32
3.5 Determinação da atividade trealase.....	32
3.6 Determinação da atividade em gel (Zimograma).....	33
3.7 Fracionamento de proteínas por cromatografia de troca iônica.....	34
3.8 Métodos analíticos.....	34
3.8.1 Quantificação de glicose.....	34
3.8.2 Quantificação de trealose.....	34
3.8.3 Quantificação de proteína.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	52
6 REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. O GÊNERO *CANDIDA* SPP.

O gênero *Candida* consiste em um grupo heterogêneo de leveduras, agrupado nos fungos mitospóricos e que normalmente existe em duas formas: leveduras (células simples) e hifas (micélio, pseudomicélio) (BERLESE, 1895). O gênero não exhibe ciclo sexual, mas algumas espécies apresentam a forma teleomórfica (forma "perfeita" ou sexuada). Esta forma já foi encontrada em dez espécies de *Candida*, com exceção de *Candida glabrata*, que apresenta um ciclo de vida assexuado e haplóide (BARNETT et al., 1983; MEYER et al., 1984; KURTZMAN E FELL, 1998; WONG, 2002).

Candida spp. são encontradas como parte normal da microflora das superfícies mucosas humanas (causando vaginites, infecções orofaríngeas, sapinhos, infecções urogenitais). Em pacientes imunocomprometidos, elas causam infecções sistêmicas graves e candidemia (BECK-SAGUE E JAWRIS, 1993; KREMERY et al., 1998; VAZQUEZ et al., 1998; FIDEL et al., 1999; NUCCI E COLOMBO, 2002; NGUYEN et al., 1996; BERROUANE et al., 1999). Nas últimas quatro décadas, as taxas de infecções por *Candida* spp. tem crescido fortemente. As espécies de *Candida* estão em quarto lugar na patogenia por candidíases oportunistas nosocomiais, causando alta morbidade e mortalidade (EDMOND et al., 1999; MAQUELIN et al., 2002).

1.2. *CANDIDA GLABRATA*

Taxonomicamente a levedura *Candida glabrata* pertence à classe Ascomycetes, ordem Sacaromicetales, família Sacaromicetaceae (<http://www.doctorfungus.com.org>). Em contraste com outras espécies de *Candida*, não apresenta dimorfismo (KOMSHIAN et al., 1989; HITCHCOCK et al., 1993), sendo uma levedura monomórfica e haplóide. Historicamente é considerada uma levedura saprofítica e não patogênica de indivíduos saudáveis (FIDEL et al., 1999). Mas é encontrada na forma de blastoconídio tanto na forma comensal como na patogênica (KOMSHIAN et al., 1989; HITCHCOCK et al., 1993). Os blastoconídios de *C. glabrata*, também denominados gêmulas, derivam do brotamento da célula-mãe, podendo formar cadeias (pseudo-hifas, cujo conjunto é o pseudomicélio), são células ovais com 1-4 µm de

diâmetro, suas colônias são pastosas, com coloração branca ou creme, brilhantes (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990; LARONE, 1995; <http://www.doctorfungus.org>).

A maioria das espécies de leveduras patogênicas emergentes pertence ao gênero de *Candida* spp. *C. glabrata* é uma das espécies de leveduras patogênicas emergentes e oportunistas mais encontradas em amostras de laboratórios clínicos (FENN et al., 1999). *C. glabrata* é freqüentemente isolada de cateteres intravenosos, fezes, urinas e superfícies do corpo de pacientes oncológicos e com HIV, pacientes transplantados, com diabetes *mellitus*, queimaduras e neonatos (AISNER et al., 1976; HICKEY et al., 1983; WINGARD et al., 1993; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; KAO et al., 1999). Invade o hospedeiro geralmente através do trato urogenital, pulmões e outras superfícies mucosas, induzindo à formação de infiltrados purulentos (HAZEN, 1995).

Infelizmente, poucas investigações têm sido feitas com *C. glabrata*, quando comparadas à outras espécies de *Candida*, embora infecções por *C. glabrata* ocupem o segundo lugar em freqüência de infecção por leveduras patogênicas, perdendo somente para *C. albicans* e sendo de difícil tratamento (DEBERNARDIS et al., 1996; FIDEL et al., 1996). Em parte, esta dificuldade se dá pelo uso generalizado de agentes imunossupressivos e terapias antimicóticas (antifúngicos azólicos, por exemplo) de amplo espectro, levando à redução da susceptibilidade deste patógeno à droga (FIDEL et al., 1999; SOBEL, 2000).

Infecções por *C. glabrata* tem aumentado na última década e quando invasivas, são associadas com alta taxa de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos como pacientes com HIV, da Unidade de Terapia Intensiva, dos pós-cirúrgico, os neutropênicos, além dos pacientes fungêmicos (FIDEL et al., 1999; SOBEL, 2000).

C. glabrata, que por um longo tempo foi a segunda maior levedura causadora da candidúria e candidose vaginal, também se tornou a segunda espécie mais encontrada nos isolados de leveduras nos casos de candidemia e micoses sistêmicas (FIDEL et al., 1999). A freqüência de candidemia aumentou de 2% em 1987 para 26% em 1992 nos EUA, e de 6% para 17% na Holanda (PRICE et al., 1994). O Programa de vigilância epidemiológica SENTRY, realizou nos EUA, Canadá, América Latina e Europa, um estudo e constatou que 55% das infecções

da corrente sanguínea ocasionadas por leveduras eram devido a *C. albicans*, seguidas de *C. glabrata* e *C. parapsiplosis*, cada uma participando em aproximadamente 15% das micoses (PFALLER et al., 2001). No Sul do Brasil (Porto Alegre), um estudo recente constatou que enquanto no período de 1995-2003 a levedura *C. glabrata* era responsável por 3,5% das infecções, entre 2005-2007 passou a ser de 10,6%, com maior incidência em hospitais com alto consumo e uso de fluconazol (PASQUALOTTO et al., 2008).

O grande perigo da infecção por *C. glabrata* resulta da sua baixa sensibilidade aos antifúngicos azólicos (azóis), normalmente usados para tratamentos de infecções fúngicas, sendo naturalmente e rapidamente resistente aos mesmos, o que contribui para sua prevalência clínica. O uso prolongado de cetoconazol e fluconazol, por exemplo, está sabidamente relacionado ao aparecimento de infecções por *C. glabrata* (VAN DER BOSSCHE et al., 1992; FIDEL et al., 1999; CROSS et al., 2000; BODEY et al., 2002).

Estudos recentes revelaram que a MIC (Concentração Inibitória Mínima) de azóis de amplo espectro para *C. glabrata* são maiores do que aquelas para os isolados de *C. albicans* (PFALLER et al., 2003); *C. glabrata* e *C. krusei* são 4 a 32 vezes menos suscetíveis que *C. albicans* ao fluconazol (DIEKEMA et al., 2002).

O fluconazol é um triazol solúvel em água com uma biodisponibilização maior que 90% após a administração oral. Tem sido usado extensivamente na profilaxia e terapia de candidoses em receptores no transplante de medula óssea, em pacientes submetidos à quimioterapia, e pacientes com HIV (BODEY et al., 2002). Em comparação com outros azóis, o fluconazol tem algumas vantagens: solubilidade em água, estabilidade no trato gastrointestinal (podendo ter administração parenteral), baixa toxicidade e ataque seletivo em células de leveduras que contém ergosterol em suas membranas citoplasmáticas. O mecanismo de ação se dá pela reação do nitrogênio da molécula do azol com o ferro do grupamento heme da Erg11 (lanosterol 14 α -demetilase) de leveduras (VAN DEN BOSSCHE et al., 1983; YOSHIDA E AOYAMA, 1987). A Erg11 é um citocromo P450 envolvido na biossíntese do ergosterol que é essencial para as leveduras, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* em condições aeróbicas (SONG et al., 2004).

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência azólica observada em isolados clínicos de leveduras. Por exemplo, o aumento

do conteúdo da Erg11, alvo dos principais agentes antifúngicos azólicos, está relacionado à resistência azólica (MARICHAL et al., 1997). Outro mecanismo de resistência está relacionado a transportadores que realizam o efluxo de azóis na membrana (MIYAZAKI et al., 1998; SANGLARD et al., 1999; SANGLARD et al., 2001; HENRY et al., 2000).

Em *C. albicans*, um mecanismo chave que envolve a resistência adquirida a azoles é a “*up regulation*” de transportadores multi-drogas, resultando no efluxo de azoles da célula (Figura 1.1). Os transportadores que têm demonstrado papéis na resistência azólica incluem transportadores ABC (ATP binding cassetes) codificados pelos genes CDR1 e CDR2, e transportadores MFS (superfamília dos facilitadores maiores), codificado pelo gene MDR1 (PRASAD et al., 2004). Similarmente *C. glabrata* é hábil em adquirir resistência azólica primariamente por sobre-expressão de dois transportadores ABC: CDR1 e PDH1 (também conhecido como CDR2) (MIYAZAKI et al., 1998; SANGLARD et al., 1999; HENRY et al., 2000; SANGLARD et al., 2001).

No entanto, outra variável foi encontrada por conferir resistência azólica em *C. glabrata*: a perda total ou parcial do seu genoma mitocondrial (mtDNA) por mutações, sendo seus representantes chamados de “mutantes petites”. O bloqueio da respiração, ou a deleção do mtDNA, em *C. glabrata*, evidencia um decréscimo na susceptibilidade a azóis, culminando em resistência azólica, além de o próprio antifúngico induzir às mutações “petites” (BRUN et al., 2004). Esta deleção, porém, não é letal para a levedura *C. glabrata* que, por outro lado, em seu estilo de vida patogênico, pode obter vantagens com a mitocôndria não funcional (DEFONTAINE et al., 1999; SANGLARD et al., 1999; BOUCHARA et al., 2000).

Barns (1991) comparando a relação evolutiva no gênero *Candida*, com base na homologia do rRNA 18S seqüenciado, concluiu que *C. glabrata* é evolutivamente mais relacionada com *S. cerevisiae* do que a outros fungos patogênicos, incluindo *C. albicans* (vide Figura 1.2). Esta maior proximidade a *S. cerevisiae* foi confirmada após filogenia baseada nos genomas de uma serie de leveduras (DUJON et al., 2004; DIETRICH et al., 2004; KELLIS et al., 2004). O genoma de 12.3 Mb de *C. glabrata*, linhagem CBS138, seqüenciada pelo programa Genelevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>); DUJON et al.,

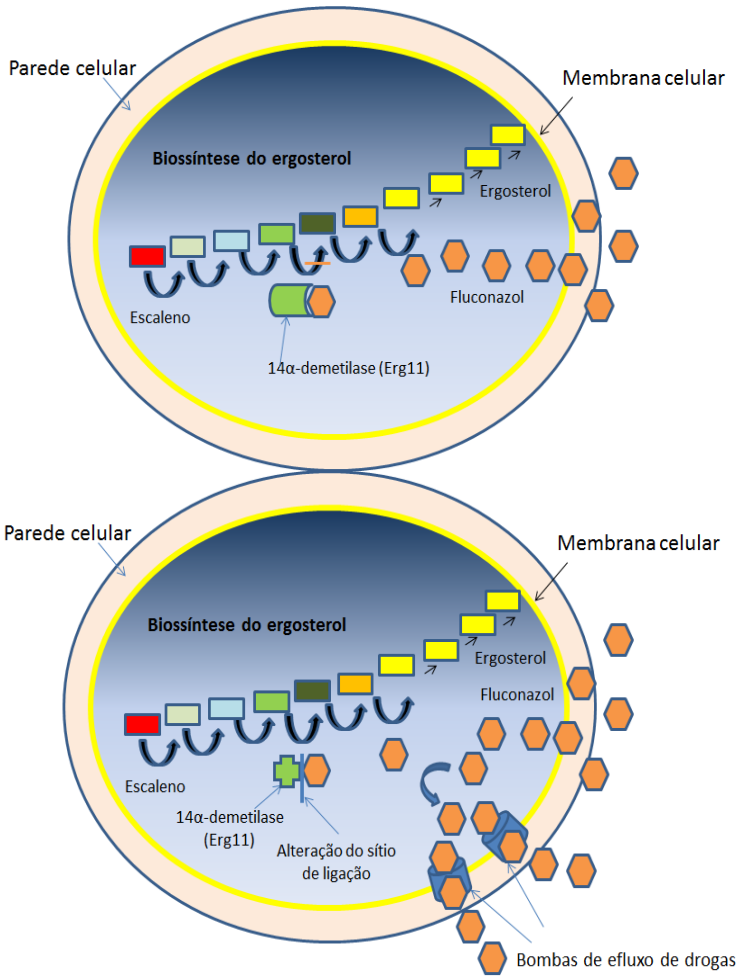


Figura 1.1. Mecanismos de resistência a antibióticos em leveduras. O fluconazol inibe uma das etapas chaves da biossíntese do ergosterol nas membranas celulares em leveduras (acima). Em *C. glabrata*, mutações no gene *ERG11* (lanosterol demetilase) impedem a ligação do fluconazol, ou ocorre também mutações que levam à sobreexpressão de bombas de efluxo de drogas (abaixo).

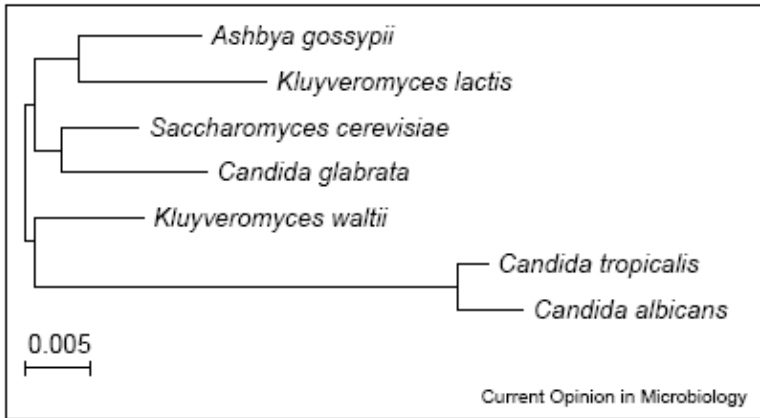


Figura 1.2. Filogenia de *C. glabrata* com outras leveduras baseada na sequência do RNA 18S. (KAUR et al., 2005)

2004;) compreende 13 cromossomos, com um conteúdo de 38% de bases C-G, o que se assemelha com *S. cerevisiae* (também 38.3%). De fato possui 65% de identidade com *S. cerevisiae* na sequência de aminoácidos de proteínas ortólogas das duas espécies. Apesar da similaridade entre proteínas ortólogas de *S. cerevisiae* e *C. glabrata*, esta racionalizou um pouco sua capacidade metabólica, possivelmente por sua íntima associação com hospedeiros mamíferos. Por exemplo, o genoma de *C. glabrata* perdeu genes envolvidos na assimilação de galactose, maltose e sacarose, no metabolismo de fosfato, nitrogênio e enxofre, assim como genes envolvidos na biossíntese de tiamina, piridoxina e ácido nicotínico (DUJON et al., 2004).

A limitação na assimilação de açúcares por *C. glabrata* tem importância no diagnóstico rápido de infecções causadas pela mesma, aumentando, assim a eficiência de terapêutica específica, principalmente em casos de pacientes imunocomprometidos ou extremamente debilitados. *C. glabrata* assimila somente o dissacarídeo trealose e a glicose, o que representa uma fração significativamente menor de açúcares em relação a outras leveduras, incluindo *S. cerevisiae* e *C. albicans* (HAZEN, 1995).

Para a rápida identificação de *C. glabrata*, vários testes rápidos de trealose (RTT) foram desenvolvidos. Estes têm a vantagem de serem

altamente reprodutíveis quando se trata da identificação presuntiva de *C. glabrata* em isolados primários, além do pequeno período de incubação e quantidade do inóculo (PIENS et al., 2003): Um deles, permite a obtenção de resultados em 20 minutos, sensibilidade de 94 a 98% e especificidade de 97,3 a 98,6. Estes testes são baseados na rápida hidrólise do açúcar trealose realizada pela *C. glabrata*, quando comparadas às demais leveduras, pois nenhuma delas hidrolisa trealose tão rapidamente quanto *C. glabrata*. Além da rapidez na hidrólise, estes testes se baseiam na capacidade de *C. glabrata* assimilar trealose e não maltose, diferentemente da maioria das leveduras (PIENS et al., 2003; WILLINGER et al., 2005).

1.3. METABOLISMO DE TREALOSE

Trealose (Figura 1.3) é um dissacarídeo não redutor no qual duas moléculas de glicose são ligadas por uma ligação glicosídica do tipo 1,1. Embora existam três anômeros possíveis (α 1- α 1; α 1- β 1; β 1- β 1), somente trealose α 1- α 1 tem sido isolada a partir de organismos vivos. Este açúcar ocorre naturalmente como dissacarídeo e está presente com bastante frequência no mundo biológico, desde vegetais inferiores a superiores, como em leveduras e fungos (TREVELYAN E HARRISON, 1956; ELBEIN et al., 1974; NWAKA E HOLZER, 1998). Trealose também é encontrada em bactérias, insetos (hemolinfa, larva e pupa), ovos de vermes (*Ascaris lumbricoides*) e outros invertebrados (FAIRBAIRN E PASSEY, 1957; WYATT E KALF, 1957; FAIRBAIRN, 1958; MARTIN et al., 1986).

Originalmente, a trealose era considerada molécula de reserva energética para a célula, ou ainda para a síntese de componentes celulares. Porém, se sabe que a trealose é muito mais que um composto de reserva. Tem função estrutural, de transporte, pode estar envolvida na sinalização ou regulação, protetora de membrana e proteínas nas condições adversas (estresse, calor, frio, dessecação e anoxia), além de muitas outras propriedades (TAKAYAMA E ARMSTRONG, 1976; CROWE et al., 1984).

Na proteção protéica, a trealose pode preservar proteínas lábeis (por exemplo, a fosfofrutocinase) durante a desidratação. Este tetrâmero que irreversivelmente se dissocia para inativar os dímeros durante processos de seca, tem apenas dissacarídeos como efetivos

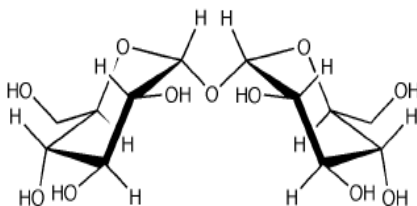
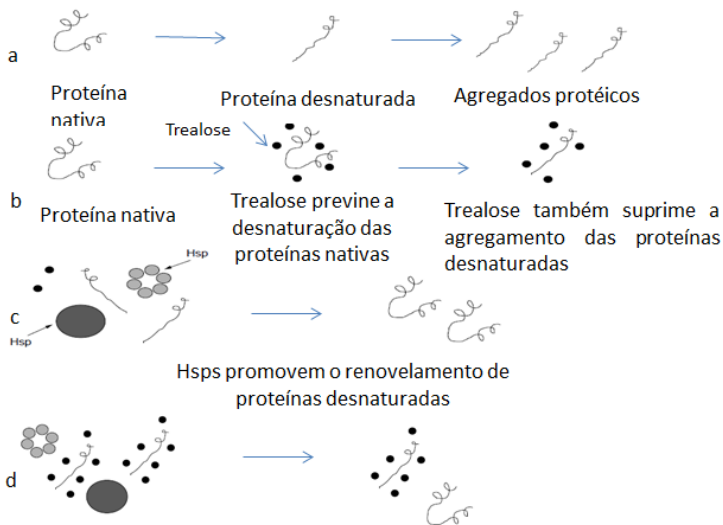


Figura 1.3. Estrutura da trealose. (ELBEIN et al., 2003)

estabilizantes, prevenindo sua dissociação em períodos de seca (CARPENTER E CROWE, 1989). Concentrações fisiológicas de trealose são capazes de proteger enzimas de leveduras da inativação por calor *in vitro*, reduzindo a formação de agregados protéicos induzidos pelo calor (DE VIRGILIO et al., 1994; SINGER E LINDQUIST, 1998; vide Figura 1.4). As diferentes fases de crescimento de fungos e leveduras, incluindo o brotamento, conidiação e germinação, estão caracterizadas pelo acúmulo e mobilização de trealose (WIEMKEN et al., 1990). Em leveduras, o estímulo que desencadeia a resposta ao choque térmico também causa acúmulo de trealose. De fato, pelo menos duas subunidades do complexo de síntese da trealose de *S. cerevisiae* são ativamente sintetizados durante o choque térmico (BELL et al 1992). Quando a temperatura de culturas crescendo em fase exponencial de *S. cerevisiae* são abruptamente mudadas de 28°C para 40°C graus, a trealose é imediatamente acumulada. Propõe-se que a rápida acumulação da trealose induzida pelo choque térmico pode ser explicada pelas mudanças nas propriedades cinéticas das enzimas envolvidas na síntese e degradação de trealose (NEVES E FRANÇOIS, 1992).

Há modelos que explicam, por exemplo, o efeito de proteção da trealose na membrana da célula de levedura durante os processos de desidratação-hidratação e congelamento-descongelamento. O modelo mais aceito é o proposto por Crowe et al. (1984), pelo qual a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana, substituindo a água (Figura 1.5). Com a ligação da trealose à membrana não há alteração do espaçamento entre os fosfolipídios,



A persistência de altos níveis de trealose interfere no renovelamento das proteínas desnaturadas pelas chaperonas

Figura 1.4. Trealose e renovelamento de proteínas por chaperonas após choque térmico. (a) Altas temperaturas causam desnaturação das proteínas. Proteínas desenoveladas podem associar-se e formar agregados. (b) *S. cerevisiae* sintetiza altas quantidades de trealose durante o choque térmico. O dissacarídeo estabiliza proteínas no seu estado nativo durante as condições estressantes e também suprime o agregamento de proteínas já desnaturadas. (c) Células de leveduras normalmente degradam trealose rapidamente após o choque térmico. Durante a recuperação, as chaperonas promovem reativação das proteínas desnaturadas, que não sofreram agregamento pela presença de trealose. (d) A persistência de altos níveis de trealose interfere na reativação das proteínas desnaturadas. Adaptada de Singer e Lindquist (1998a).

evitando assim as separações laterais dos componentes da membrana. Com a substituição das moléculas de água pela trealose não há passagem da fase fluida para a fase gel da membrana, mantendo-se a integridade e a fluidez da membrana, e assim, a viabilidade celular (CROWE et al., 1984).

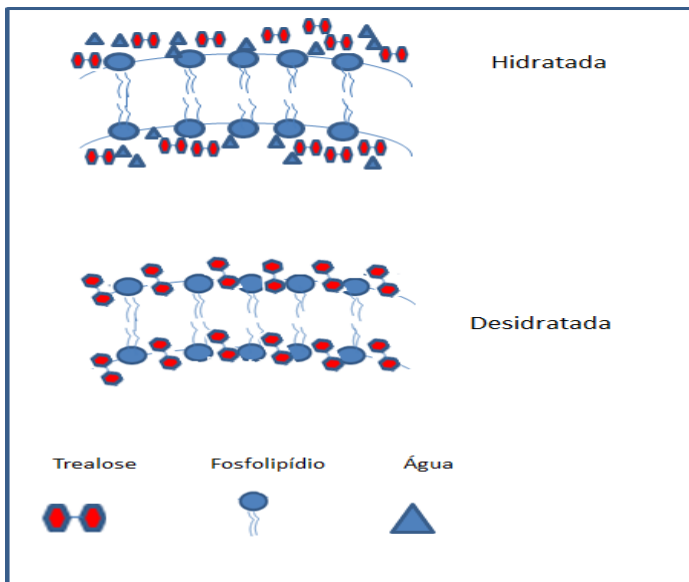


Figura 1.5. Proteção de membranas pela trealose na desidratação. As membranas celulares sofrem proteção pela trealose quando a célula sofre desidratação. A trealose ocupa as cabeças polares das membranas protegendo-as da desagregação.

Quanto à sua biossíntese, a trealose é sintetizada pelo menos por duas vias diferentes, sendo que várias outras vias degradativas também podem ser utilizadas para produzir este dissacarídeo. Estas várias vias levam à produção da trealose-6-fosfato, ou trealose livre. A via mais comum de biossíntese da trealose ocorre em duas reações, sendo a primeira catalisada pela enzima trealose fosfato sintase (TFS, EC 2.4.1.15) e envolve a transferência de glicose a partir de UDP-glicose a glicose-6-fosfato, obtendo desta forma a trealose-6-fosfato (T6F) e uridina difosfato (UDP). Na segunda reação, a enzima trealose fosfato fosfatase (TFF, EC 3.1.3.12) então converte a trealose-6-fosfato em trealose livre (CHEN E HADDAD, 2004; SCHLUEPMANN et al., 2004; KOSMAS et al., 2006). A reação, sendo irreversível, requer a presença de íons Mg^{2+} e pH ótimo de 6,6 (CABIB E LELOIR, 1958).

Esta reação foi descrita primeiramente em leveduras e desde então tem sido demonstrada em inúmeros organismos, incluindo insetos,

Mycobacterium tuberculosis e *Dictyostelium discoideum* (CABIB E LOLOIR, 1958; CANDY E KILBY, 1958; MURPHY E WYATT, 1965; ROTH E SUSSMAN, 1966). Em *S. cerevisiae* a TFS está presente como parte de um complexo que é formado por quatro subunidades. Uma destas subunidades, a *TFS1* (trealose-6-P sintetase - 56 kDa) é a sintase, a *TFS2* (trealose-6-P fosfatase - 102 kDa) é uma trealose fosfatase, e as outras duas subunidades (*TFS3* e *TS11* - 123 kDa) são conhecidas como regulatórias com alta homologia entre si (BELL et al., 1998).

Há indícios de que a utilização deste complexo enzimático por *S. cerevisiae* para sintetizar trealose tenha a ver com a função regulatória do mesmo no metabolismo e/ou interação entre metabolismo de trealose, glicólise e fermentação (NOUBANI et al., 2000). *TFS1* sintetizando trealose 6-fosfato tem uma função regulatória que restringe a atividade de cinases e portanto a entrada de glicose na célula (THEVELEIN, 1992). Quando há um aumento da trealose, ocorre uma diminuição na fosforilação das moléculas de glicose e frutose pela enzima hexocinase, regulando o influxo de açúcares da via da glicólise, pois trealose 6-fosfato inibe competitivamente as hexocinases de *S. cerevisiae*, com inibição mais forte da hexocinase II (BLAZQUEZ et al., 1993).

A enzima trealase (α , α -trealose-1-glucohidrolase, EC 3.2.1.28), é responsável pela degradação da trealose. Em *S. cerevisiae* existem dois tipos de trealases, uma localizada no citossol e regulada por fosforilação, enquanto outra trealase, permanentemente ativa, foi encontrada nos vacúolos (WIEMKEN et al., 1982). Londesborough E Varimo (1984) a seguir, ao separar estas duas atividades encontraram diferenças entre os pHs ótimos para as duas enzimas. A enzima sempre ativa (trealase vacuolar) exibe atividade máxima em pH 4,5 e por isso foi chamada de “trealase ácida”. Esta enzima foi purificada e caracterizada por Mitterbühler e Holzer (1988).

A trealase neutra, que após fosforilação exibe atividade máxima no pH 7, é também denominada “trealase regulatória” devido sua ativação por fosforilação mediada pela proteína cinase A (PKA) dependente da presença de AMP cíclico (AMPC) (UNO et al., 1983), enquanto que a sua desativação é mediada por fosfatases (APP E HOLZER, 1989). A trealase neutra de *S. cerevisiae* é um homodímero consistindo de duas subunidades com massa molecular 80-86 kDa, sendo o K_m da enzima para trealose de 35 mM (FRANÇOIS et al., 2001). Esta hidrolase é específica para trealose como substrato, não

sendo capaz de hidrolisar outros açúcares como celobiose, maltose, lactose, sacarose, ou rafinose (APP E HOLZER, 1989). A trealase neutra em *S. cerevisiae* mostra dependência de íons como Ca^{2+} e Mn^{2+} , sendo inibida por EDTA e outros íons como Zn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} (LONDESBOROUGH E VARIMO, 1984; DE ANDRADE et al., 2000).

Duas condições são conhecidas por ativar a via PKA e AMPc em *S. cerevisiae*: adição de glicose nas células de fase estacionária (ou crescendo em fontes de carbono não fermentáveis), e a acidificação intracelular. Na primeira condição (Figura 1.6), altos níveis de glicose ativam um receptor de membrana (*GPR1*) acoplado a proteína $\text{G}\alpha$ (*GPA2*), que por sua vez ativa a enzima adenilato ciclase (*CYR1*) a sintetizar AMPc (ROLLAND et al., 2000). A adenilato ciclase (MATSUMOTO et al., 1984; KATAOKA et al., 1985), é também estimulada pelas proteínas *G RAS1* e *RAS2* que são inibidas pelas proteínas *IRA1* e *IRA2*, que por sua vez são inibidas pela acidificação intracelular (JONES et al., 1981; BROEK et al., 1985; 1987; TODA et al., CAMONIS et al., 1986;; COLOMBO et al., 1998). A acidificação intracelular ocorre após a adição de glicose (pelo acúmulo de açúcares fosfatados, aumento da taxa respiratória, acúmulo de metabolitos ácidos da glicólise), desacopladores e nistatina, estes últimos ocasionando despolarização da membrana plasmática (VALLE et al., 1986). A PKA é um tetrâmero consistindo em duas subunidades catalíticas codificadas pelos genes redundantes *TPK1*, *TPK2* e *TPK3*, e duas subunidades regulatórias (TODA et al., 1987a; 1987b). No caso de *S. cerevisiae*, as subunidades de PKA responsáveis pela fosforilação da trealase neutra são *TPK1* e *TPK2* (ZHRINGER et AL., 1998). A trealase neutra de *S. cerevisiae* possui uma região consenso possível de fosforilação (Arg/Arg/Gly/Ser) entre os resíduos 22 a 25, sendo que a fosforilação ocorre no resíduo Serina-25 (KOPP et al., 1993).

Três genes que codificam trealases têm sido encontrados em *S. cerevisiae*: o gene *NTH1* que codifica a trealase neutra em *S. cerevisiae* possui uma ORF (“open reading frame”) de 2253 pb (KOPP et al., 1994). A análise do genoma desta levedura revelou, no entanto, a presença de um outro gene (que passou a ser denominado *NTH2*) com enorme homologia (77%) à *NTH1* (WOLFE E LOHAN, 1994). A expressão e função do gene *NTH2* continua fracamente elucidada,

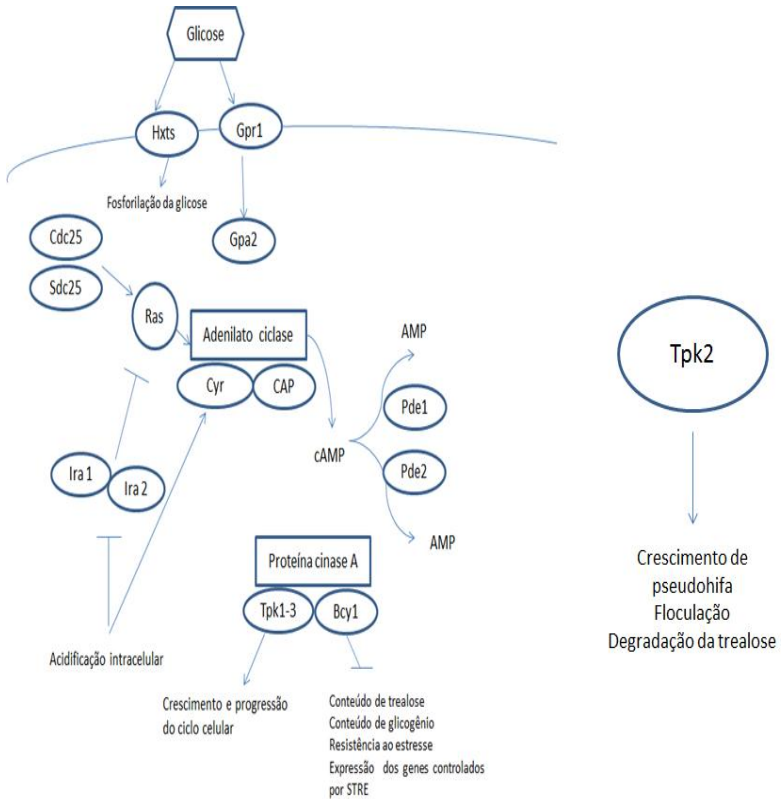


Figura 1.6. Via de sinalização mediada pela PKA/AMPC em *S. cerevisiae*. A glicose ativa o receptor acoplado à proteína G (Gpr1-Gpa2) responsável pela síntese do AMPc mediado pela adenilato ciclase (Cyr e CAP), sistema que só pode ativar a produção de AMPc em conjunto com a fosforilação da glicose. A acidificação intracelular também ativa a produção de AMPc através da ativação das proteínas Ras via proteínas G (Cdc25 e Sdc25) e inibição das proteínas Ira1 e Ira2. O AMPc, que se liga às subunidades regulatória da PKA (Bcy1), é degradado pelas fosfodiesterases (Pde1 e Pde2). Das três diferentes subunidades catalíticas da proteína cinase A (Tpk1, Tpk2, e Tpk3), a subunidade Tpk2 é a principal responsável pela fosforilação da trealase neutra e consequente degradação de trealose (destaque). Adaptado de Thevelein et. al., (2000).

embora se saiba que deleções ou sobreexpressão de *NTH2* influenciem nos níveis de trealose, bem como na atividade da trealase (NWAKA et al., 1995). O gene que codifica a trealase ácida em *S. cerevisiae* (*ATH1*), não mostra nenhuma homologia com os genes da trealase neutra (LONDESBOROUGH E VARIMO, 1984; NWAKA et al., 1996).

A trealase neutra possui considerável relevância fisiológica na manutenção e/ou decréscimo das concentrações de trealose após o estresse (DELLAMORA-ORTIZ et al., 1986), especialmente em leveduras onde a trealose regula o metabolismo e pode afetar a atividade de enzimas chave tais como hexocinase (NWAKA E HOLZER, 1998). A trealase neutra deve também ser ativada assim que o estresse de temperatura é aliviado, pois a trealose deve ser degradada rapidamente, logo após o choque térmico. Caso suas concentrações continuem altas, a mesma pode interferir com a atividade e/ou renaturação das proteínas (antes desnaturadas) mediadas por chaperonas (SINGER E LINDQUIST, 1998a, 1998b; WERA et al., 1999; NWAKA E HOLZER, 1998; FRANÇOIS E PARROU, 2001).

A expressão do gene da trealase neutra é baixa durante o crescimento exponencial da levedura, sugerindo que o gene é reprimido por glicose. Tal dependência da expressão gênica na presença de glicose é típica de genes que estão sobre repressão catabólica, sugerindo um papel desta enzima no metabolismo da glicose (NWAKA E HOLZER, 1998). Na fase estacionária da célula de leveduras há um aumento dos níveis citoplasmáticos de trealose e da expressão de genes como *NTH1*. Este aumento na expressão gênica de trealase nesta fase, assim como o aumento da concentração de trealose, podem contribuir para a tolerância ao estresse nestas células (NWAKA E HOLZER., 1998). Trealases tem sido caracterizadas em diferentes espécies de *Candida*. Por exemplo, trealases ácidas têm sido isoladas em *C. tropicalis* e *C. albicans* (LUCES E PHAFF, 1952; ARNOLD E MCLELLAN, 1975). Uma trealase neutra foi identificada em *C. utilis*, sendo esta similar à enzima de *S. cerevisiae*, pois é ativada por fosforilação por proteína cinase dependente de AMPc (ARGUELLES E GACTO, 1985; CARILLO et al., 1995).

Embora o metabolismo da trealose tenha sido extensivamente estudado em algumas espécies de leveduras, pouco é conhecido da metabolização de trealose em *C. glabrata*. Dada a alta patogenia desta levedura, e considerando que a utilização de trealose por *C. glabrata* constitui a base para sua pronta identificação laboratorial, se faz

necessário analisar em maiores detalhes a metabolização deste importante açúcar por esta levedura. Recentemente foi caracterizado que *C. glabrata* secreta no meio grandes quantidades de uma trealase ácida, o que lhe permite utilizar trealose como fonte de carbono e inclusive fermentar eficientemente este açúcar (ZILLI, 2006). De fato, a análise do genoma já seqüenciado desta levedura permitiu identificar uma ORF (*CAGL0K05137g*) que codifica para uma proteína com alta homologia à *ATH1* de *S. cerevisiae*. A obtenção de mutantes deletados neste gene de 3639 pb (que passou a ser denominado *CgATH1*) confirmou que o mesmo codifica para a trealase ácida secretada no meio, sendo estes mutantes incapazes de crescer em trealose, além de apresentarem problemas na homeostase celular durante o estresse salino (LOPES, 2010). Dados iniciais também indicam que os mutantes sem trealase ácida apresentam menor patogenicidade em modelos animais. Se faz necessário, portanto, mais estudos sobre a metabolização de trealose por *C. glabrata*, bem como analisar o papel que as diferentes trealases possuem na fisiologia deste importante patógeno emergente.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL:

Analisar a metabolização de trealose pela levedura *Candida glabrata*, com ênfase nas enzimas trealase envolvidas na degradação do açúcar.

2.2. ESPECÍFICOS

- Analisar o acúmulo e degradação de trealose durante o crescimento celular de diversas linhagens de *C. glabrata*, bem como durante um choque térmico.
- Analisar a(s) atividade(s) de degradação de trealose durante as condições acima.
- Caracterizar parcialmente, do ponto de vista bioquímico, a trealase neutra de *C. glabrata*.
- Analisar mecanismos regulatórios envolvidos na expressão da atividade da trealases de *C. glabrata*, incluindo a fosforilação por cinase dependente de AMPc.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS DE LEVEDURA ESTUDADAS.

As cepas de leveduras usadas no presente trabalho estão relacionadas na Tabela 3.1. As cepas de *C. glabrata* LEMI 6099 e 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. As cepas 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). A linhagem RY01, deletada no gene da *CgATH1*, encontra-se descrita em Lopes (2010). As linhagens de *S. cerevisiae* fazem parte da coleção de cepas do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (BQA-CCB-UFSC).

Tabela 3.1. Linhagens de levedura analisadas

Espécie e cepa	Característica e/ou genótipo
<u><i>C. glabrata</i>:</u>	
LEMI 6099	Isolado clínico (fezes)
LEMI 8228	Isolado clínico (urina)
Bg14	Cepa Bg2 (isolado clínico), mas <i>ura3Δ::Tn903Neo^R</i>
RY01	Cepa Bg14, mas <i>ath1Δ::ScURA3</i>
<u><i>S. cerevisiae</i>:^a</u>	
S288C	<i>MATα SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>

^aLinhagem com genes e metabolismo de trealose normal.

3.2. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.

As células de levedura foram crescidas em meio líquido YPD, contendo extrato de levedura 1% (p/v), bacto peptona 2%, e glicose 2%. O pH do meio era ajustado para pH 5,0 com HCl, e esterilizado a 121°C por 20 min. As células foram inoculadas no meio YPD (que ocupava no máximo 1/5 do volume do frasco para garantir aeração adequada) e incubadas num *shaker* rotatório (160 rpm) a 28°C. O crescimento das leveduras foi acompanhado a 570 nm, e correlacionado com o peso das células secas, determinado com um forno de microondas como descrito previamente (BADOTTI et al., 2008).

3.3. OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES.

As células crescidas até uma determinada fase (estacionária ou exponencial) foram coletadas e centrifugadas (3.000 g, 2 min) para remoção do meio de cultivo, e lavadas 2 vezes com água destilada a 4°C. Os extratos das células foram realizados segundo o protocolo adaptado de Neves E François (1992) (vide <http://biopuce.insa-toulouse.fr/jmflab/protocole/Neutraltrehalaseassay.htm>), com algumas modificações. As células (aproximadamente 10 mg) foram lisadas em tampão 20 mM Hepes, pH 7,1 contendo 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, USA) através de 8 ciclos de 1 min no gelo e 1 min agitando vigorosamente em tubos de ensaio de 1 cm de diâmetro contendo bolinhas de vidro (0,5 g, com 0,5 mm de diâmetro). Os sobrenadantes destes extratos (após centrifugação a 3.000 g por 5 min, e novamente a 3.000 g por 15 min) foram usados como fonte de enzima para os ensaios enzimáticos.

Para analisar a possível ativação *in vivo* pela glicose, células cultivadas até a fase estacionária foram centrifugadas e ressuspensas a 20 mg/ml em Tampão 100 mM MOPS-NaOH, pH 6, e incubadas por 30 min a 30°C em banho-maria. Após este tempo, acrescentou-se 100 mM glicose e alíquotas de 1 ml foram removidas durante 60 min para a obtenção dos extratos celulares como descrito acima.

3.4. EXTRAÇÃO DE TREALOSE

Alíquotas de 20 mg de células foram retiradas e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 g. A estas células acrescentou-se 1 ml de 10% ácido tricloroacético e agitado vigorosamente no vórtex (30 segundos), em intervalos de 5 minutos, totalizando 1 hora, sendo que durante os intervalos (sem agitação), os tubos foram mantidos em gelo. Após o período de 1 hora, o extrato foi centrifugado a 3.000 g por 2 minutos, e o sobrenadante usado como fonte de trealose extraída das células (STAMBUK et al., 1993).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TREALASE

Os extratos celulares foram incubados com 100 mM trealose e tampão de pH neutro (50 mM Hepes, pH 7,1 contendo 2,5 mM CaCl₂) ou tampão de pH ácido (100 mM Succinato-Tris, pH 4,4 contendo 2 mM EDTA) para determinar a atividade trealase neutra, e trealase ácida,

respectivamente. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 30°C, e então fervidas por 4 min para cessar a reação. Foram utilizados controles contendo extratos celulares previamente fervidos a 100°C por 5 min. A atividade específica da trealase é expressa em nmol de glicose liberada por min e por mg de proteína.

Para avaliar a ativação da trealase por fosforilação *in vitro* os extratos celulares foram incubados por 15 min a 30°C na presença de 25 mM tampão fostato de sódio, pH 7,4 contendo 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 25 μM AMPc, 25 mM NaF, e 2,5 mM teofilina. Após cessar a reação no gelo, a atividade trealase foi determinada como descrito acima. Eventualmente, os extratos celulares foram pré-incubados (2 h) com resina contendo Concaivalina A (Amersham, USA), uma lectina que tem afinidade por grupos α-D-mannopiranosídeos e α-D-glucopiranosídeos, de forma a tentar remover a trealase ácida dos extratos, uma vez que esta enzima se liga fortemente à Concaivalina A (ZILLI, 2006). Após centrifugação (3.000 g, 2 min), o sobrenadante foi utilizado para a ativação por fosforilação *in vitro* como descrito acima.

A hidrólise de 100 mM trealose pelos extratos celulares foi também determinada em tampão 100 mM succinato-Hepes com 11 faixas de pH, do pH 3,5 ao pH 8,5.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TREALASE EM GEL (ZIMOGRAMA).

As proteínas presentes nos extratos celulares foram submetidas à eletroforese usando um sistema de minigéis BioRad MiniProtean 3. Os géis não desnaturantes contendo 15% de acrilamida/bis-acilamida foram submetidos a eletroforese em tampão 1,5 M Tris-glicina, pH 8,8 numa voltagem de 200 V por 1h. A seguir a atividade trealase presente nos géis foi determinada pela incubação dos mesmos em solução contendo 100 mM trealose por 30 minutos em tampão 100 mM Tris-succinato, pH 4,4 (trealase ácida) ou tampão 50 mM Hepes-HCl pH 7,1 (trealase neutra), seguido da determinação da presença da glicose produzida da hidrólise da trealose pela posterior incubação do gel a 100°C numa solução contendo 0,05% cloreto de trifetil-tetrazolium, diluído em 0,5 M de NaOH.

3.7. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Os extratos foram aplicados em uma coluna de troca iônica Hi-Trap Q (GE Healthcare, 5 cm x 0,5 cm) equilibrada em tampão imidazol 10 mM, pH 6,0, utilizando um aparelho Akta (GE Healthcare). Em seguida foi realizada uma eluição isocrática com 8 mL de tampão imidazol para lavagem das proteínas não retidas e, a seguir, foram aplicados 20 mL de um gradiente linear com a concentração de cloreto de sódio aumentando de 0 a 1 M no mesmo tampão imidazol, seguidos de uma eluição isocrática com 5 mL de tampão imidazol contendo 1 M NaCl, pH 6,0. Foi utilizado um fluxo de 1,0 mL/minuto em todo processo e foram coletadas frações de 0,5 mL. A atividade trealase nas frações foi determinada em pH 7,1 e 4,4 como descrito acima.

3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.8.1. Quantificação de glicose.

A concentração de glicose foi determinada enzimaticamente utilizando-se glicose oxidase e peroxidase através de um kit enzimático comercial (Bio-Técnica, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

3.8.2. Quantificação de trealose.

Os sobrenadantes após extração dos carboidratos totais das células com 10% ácido tricloroacético, foram utilizados para determinar a concentração de trealose a 620 nm após reação com Antrona (BRIN, 1966). Glicose (2-20 µg) foi utilizada como padrão de açúcar na quantificação por Antrona.

3.8.3. Quantificação de proteína.

A concentração de proteína nos extratos celulares foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No intuito de analisar a metabolização de trealose por *C. glabrata*, o acúmulo e/ou degradação intracelular deste açúcar foi determinado ao longo do crescimento das células de levedura em glicose. Como pode ser observado na Figura 4.1, células da linhagem LEMI 8228 de *C. glabrata* consomem rapidamente a glicose presente no meio, atingindo a fase estacionária do crescimento em aproximadamente 12 hs (Fig. 4.1A). Durante o crescimento exponencial desta cepa ocorre degradação da trealose intracelular, e quando as células entram na fase estacionária, a trealose começa a ser acumulada, ocorrendo um aumento na sua concentração celular (Fig. 4.1B). A atividade trealase presente nas células durante o crescimento (Figura 4.2) revelou um perfil de atividade semelhante, sendo que durante o crescimento exponencial em glicose a atividade da trealase ácida e trealase neutra diminuem significativamente, aumentando apenas após a exaustão da glicose no meio (vide Fig. 4.1 e 4.2).

Padrão semelhante de acúmulo e degradação intracelular de trealose foi observado com outra linhagem de *C. glabrata* (cepa Bg14, vide Figura 4.3), embora no caso desta linhagem o consumo da glicose tenha sido mais lento (Fig. 4.3A), e as concentrações de trealose intracelular significativamente maiores dos que os obtidos com a linhagem LEMI 8228 (Fig. 4.3B, vide também Fig. 4.1B). Entretanto, a atividade trealase nestas células da linhagem Bg14 (tanto a trealase ácida quanto a neutra) apresentaram valores (Figura 4.4) muito próximos aos observados com a linhagem LEMI 8228 (Fig. 4.2), e com o mesmo perfil de baixa atividade durante o crescimento exponencial em glicose, e atividades maiores na fase estacionária do crescimento.

Em fungos e leveduras o acúmulo de trealose está associado a períodos de escassez de nutrientes. Escassez de glicose, nitrogênio, fosfato ou enxofre induzem o acúmulo de trealose pelas células, sendo um exemplo clássico o começo da síntese da trealose coincidente com o fim da fase exponencial do crescimento celular (THEVELEIN, 1984). De fato, na fase logarítmica do crescimento as leveduras tem baixas concentrações de trealose, mas quando elas chegam a fase estacionária do crescimento, os níveis de trealose aumentam. (GADD et al., 1987). Estimulo ao crescimento de células em dormência de *S. cerevisiae* e *C. albicans* estão associadas à rápida mobilização da trealose.

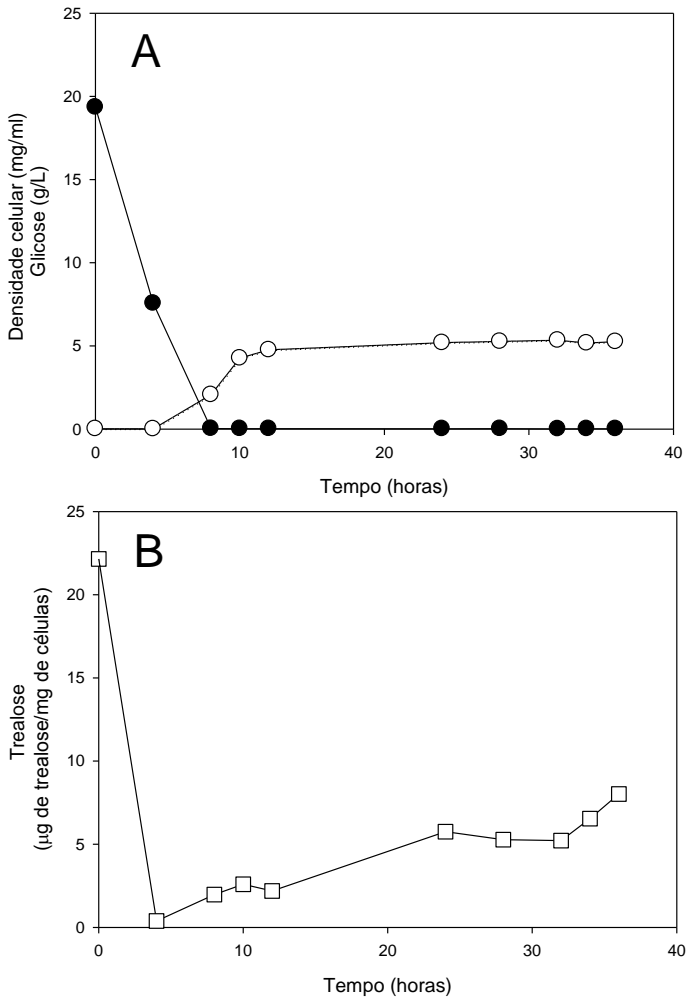


Figura 4.1. Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% glicose pela cepa LEMI 8228 de *C. glabrata*. Nos tempos indicados foi quantificado (A) o consumo de glicose (●) e crescimento celular (○) no meio YPD, bem como (B) a quantidade intracelular de trealose presente nas células de levedura (□), como descrito em Materiais e Métodos.

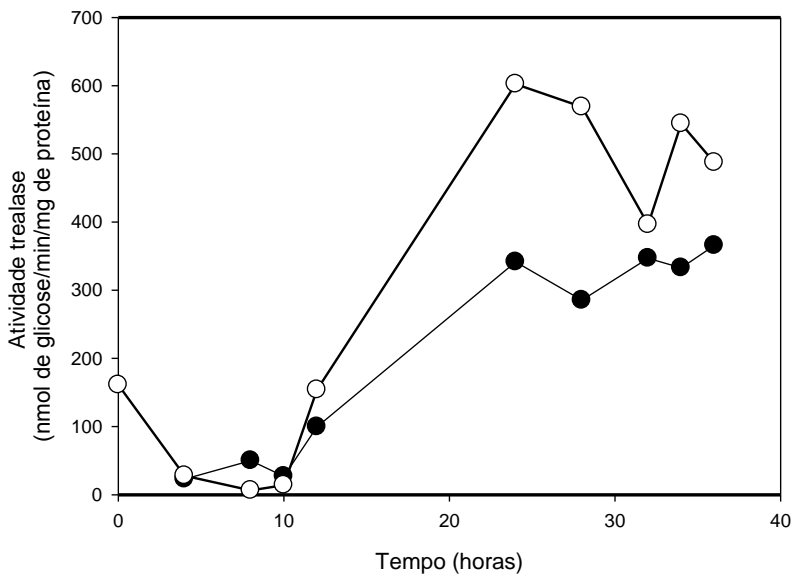


Figura 4.2. Atividade trealase durante o crescimento em 2% glicose por células da cepa LEMI 8228 de *C. glabrata*. Extratos celulares foram obtidos ao longo do crescimento das células em meio YPD, e dosada a atividade de hidrólise de trealose em pH 4,4 (—○—) e no pH 7,1 (—●—) como descrito em Material e Métodos.

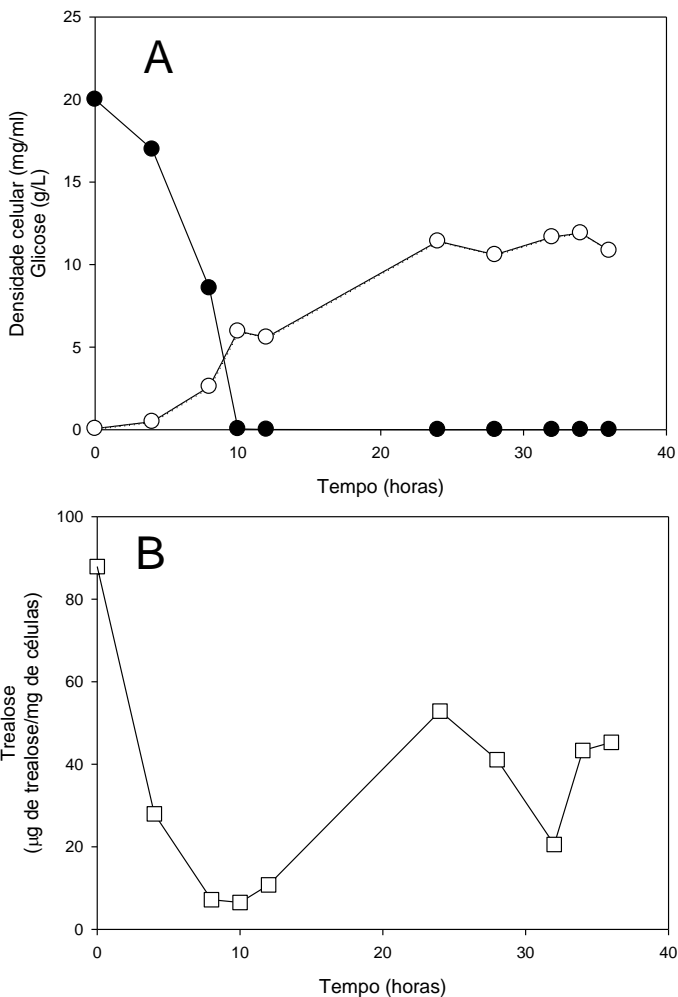


Figura 4.3. Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% glicose pela cepa Bg14 de *C. glabrata*. Nos tempos indicados foi quantificado (A) o consumo de glicose (●) e crescimento celular (○) no meio YPD, bem como (B) a quantidade intracelular de trealose presente nas células de levedura (□), como descrito em Materiais e Métodos.

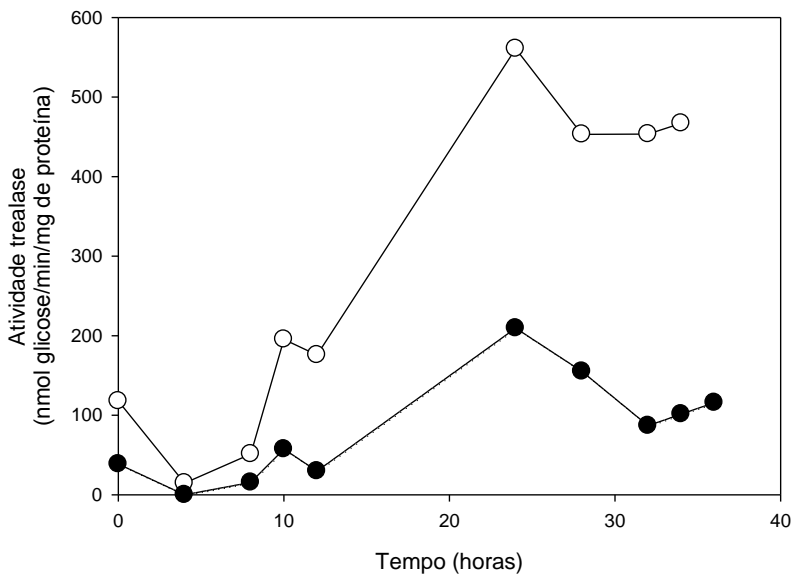


Figura 4.4. Atividade trealase durante o crescimento em 2% glicose por células da cepa Bg14 de *C. glabrata*. Extratos celulares foram obtidos ao longo do crescimento das células em meio YPD, e dosada a atividade de hidrólise de trealose em pH 4,4 (—○—) e no pH 7,1 (—●—) como descrito em Material e Métodos.

Entretanto, as atividades das trealases ácida e neutra em *C. glabrata* (Fig. 4.2 e 4.4) apresentaram um perfil semelhante durante o crescimento em glicose, embora tenha sido descrito que em *S. cerevisiae* ou *C. albicans* a trealase neutra é preferencialmente expressa durante a fase exponencial do crescimento em glicose, com baixa atividade na fase estacionária do crescimento, enquanto que a trealase ácida apresenta comportamento oposto (SAN MIGUEL E ARGUELLES, 1994; SÁNCHEZ-FRESNEDA et al., 2009). Por outro lado, considerando que *C. glabrata* expressa enormes quantidades da trealase ácida (ZILLI, 2006), nossos resultados de atividade trealase ácida e neutra seguindo praticamente o mesmo perfil de atividade ao longo do crescimento nos prontificou a melhor caracterizar as atividades presentes no extrato celular.

Na Figura 4.5 é possível observar apenas um único pico de atividade trealase, com maior atividade (pH ótimo) em torno do pH 4,5 a 5,5, não sendo possível distinguir nenhuma atividade enzimática preferencialmente ativa no pH neutro (embora nesta faixa de pH as atividades apresentam-se altas, >100 nmol/min/mg). Este resultado poderia estar indicando que a atividade da trealase ácida, por ser significativamente alta nesta levedura, poderia estar mascarando ou até interferindo na determinação da atividade trealase neutra. De fato, no decorrer do presente trabalho um artigo publicado questionou a distinção entre os dois tipos de trealases, em *C. albicans*, baseado apenas no pH ótimo de atividade (SÁNCHEZ-FRESNEDA et al., 2009). Esta alta atividade trealase ácida também interferia consideravelmente nas nossas tentativas de verificar a possível ativação da trealase neutra pelo AMPc e cascata de fosforilação mediada pela proteína cinase A (vide a seguir).

Como pode ser observado na Figura 4.6, extratos celulares obtidos da linhagem Bg14, quando submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentaram apenas a atividade da trealase ácida com uma alta massa molecular (275 kDa, vide Figura 4.6.A) característica desta enzima glicosilada (ZILLI, 2006). Inúmeras tentativas de revelar no gel a atividade da trealase neutra, que possui uma massa molecular menor (~86 kDa) e que portanto seria esperado ser detectada numa posição mais à frente da corrida eletroforética, foram infrutíferas (dados não mostrados). Por outro lado, tentativas de separar as duas enzimas

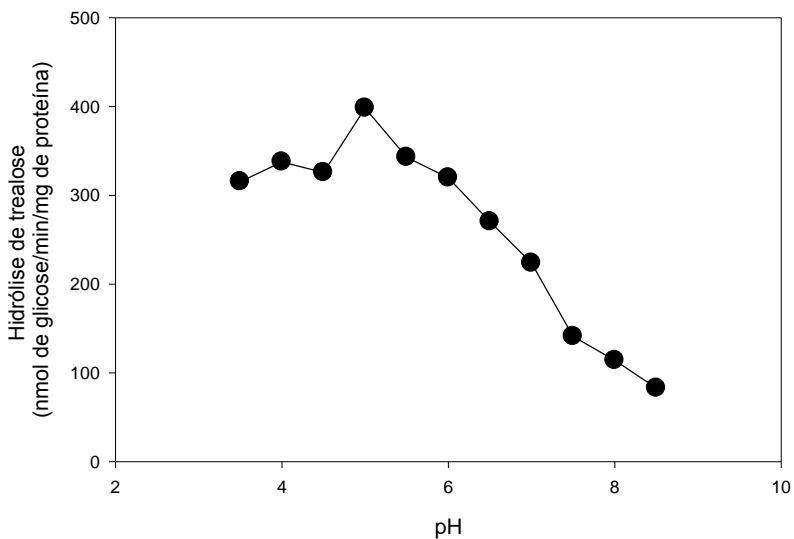


Figura 4.5. Hidrólise de trealose em função do pH pela linhagem Bg14 de *C. glabrata*. As células foram crescidas em YPD por 24 hs e a atividade de hidrólise de trealose pelo extrato celular obtido foi determinada a diferentes pHs como descrito em Material e Métodos.

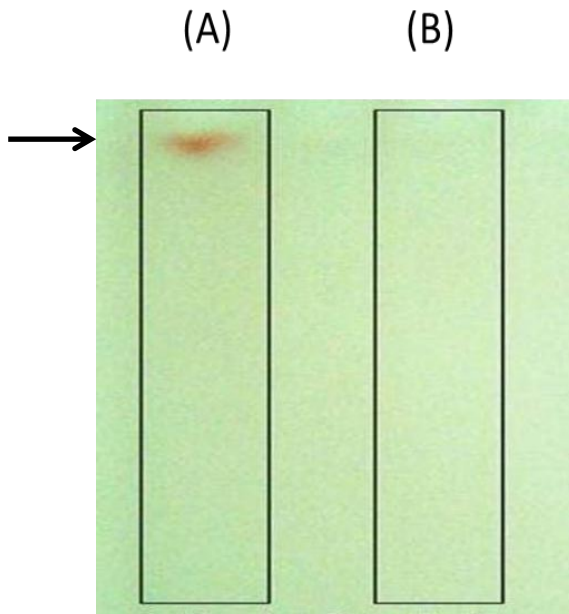


Figura 4.6. Zimograma mostrando a determinação da atividade trealase após separação das proteínas em gel de poliacrilamida. Extratos celulares da linhagem Bg14 (A) ou RY01 (B) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida, e a atividade da trealase (determinado em tampão de pH 4,4) revelada como descrito em Material e Métodos. A seta indica a posição da trealase ácida de alto peso molecular (275 kDa).

por cromatografia de troca iônica, baseadas no ponto isoelétrico das enzimas (trealase ácida com um pI de 4,652, e trealase neutra com um pI de 6,99, baseado na sequência de aminoácidos predita a partir dos genes presentes no genoma de *C. glabrata*), também foram infrutíferas uma vez que o primeiro pico de proteínas eluídas da coluna, onde se esperava a presença de apenas a atividade da trealase neutra, não mostrou maior atividade no pH 7,1 e, pelo contrário, foram encontrados altos níveis de atividade no pH 4,4 (dados não mostrados).

No intuito de melhor caracterizar e determinar o papel que as trealases desempenham na metabolização de trealose por *C. glabrata*, decidimos realizar a análise do metabolismo (consumo e/ou degradação de trealose intracelular) por uma linhagem de *C. glabrata* deletada no gene da trealase ácida.

Na linhagem RY01 (isogênica à linhagem Bg14, que é *ura3*) o gene da *CgATH1* foi substituído, por recombinação homóloga, pelo gene *URA3* de *S. cerevisiae* (LOPES, 2010). Esta linhagem não apresenta a atividade trealase ácida (como pode ser observado na Fig. 4.6.B), e fenotipicamente estas células são incapazes de crescer utilizando trealose como fonte de carbono, além de apresentam problemas na homeostase celular durante o estresse salino (LOPES, 2010). Entretanto, nestas células é possível sim determinar a presença de uma clara atividade trealase neutra, com um pH ótimo em torno do pH 6,5-7,0 (Figura 4.7). Novamente, inúmeras tentativas de revelar no gel a atividade da trealase neutra nestes extratos da linhagem RY01 foram infrutíferas (dados não mostrados). Cabe salientar que os níveis máximos de atividade (>70 nmoles/min/mg) presentes nesta linhagem deletada no gene *CgATH1* (Fig. 4.7) são consideravelmente menores do que a atividade presente nas células selvagens (cepa Bg14, vide Fig. 4.5), novamente mostrando como a atividade da trealase ácida pode interferir com a determinação da atividade trealase neutra.

A Figura 4.8 mostra a metabolização (consumo e/ou degradação de trealose intracelular) pela linhagem RY01 de *C. glabrata*, deletada no gene da trealase ácida. Como é possível verificar nesta figura, tanto o crescimento em glicose quanto a metabolização da trealose intracelular pela linhagem deletada na trealase ácida apresentam os mesmos padrões obtidos com a linhagem selvagem Bg14, indicando que a trealase neutra citoplasmática seria responsável pela degradação da trealose intracelular quando as células de *C. glabrata* estão crescendo exponencialmente em glicose. Curiosamente, a atividade da trealase neutra durante o

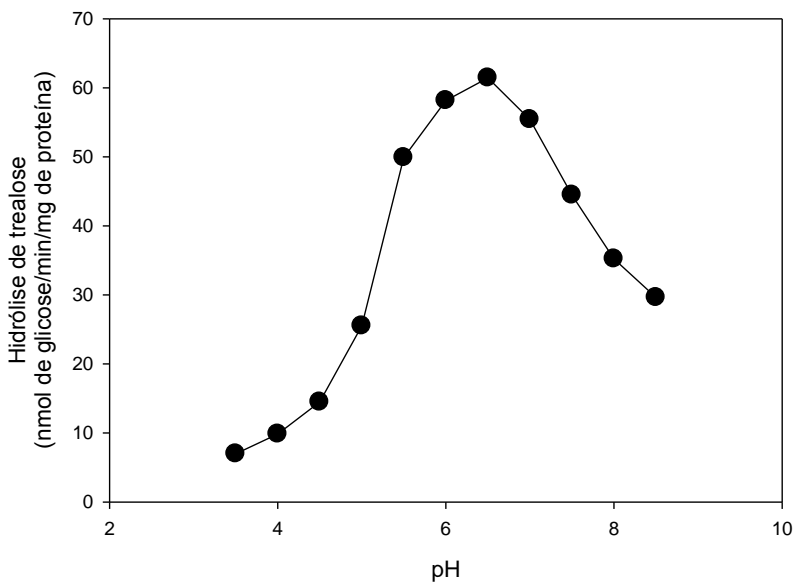


Figura 4.7. Hidrólise de trealose em função do pH pela linhagem RY01 de *C. glabrata*. As células foram crescidas em YPD por 24 hs e a atividade de hidrólise de trealose pelo extrato celular obtido foi determinada a diferentes pHs como descrito em Material e Métodos.

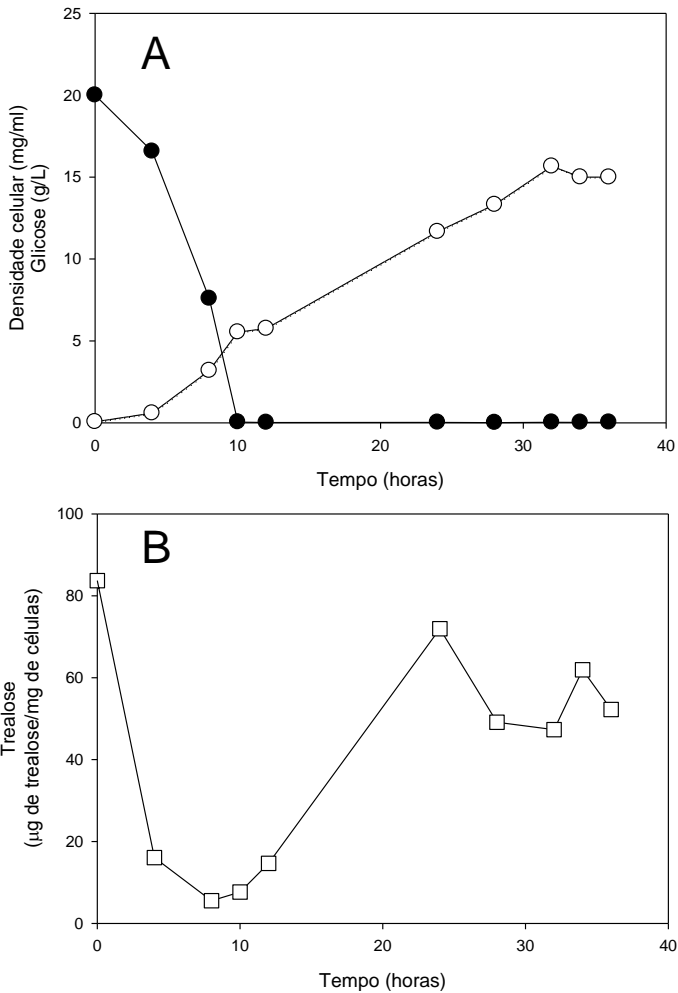


Figura 4.8. Metabolização de trealose durante o crescimento em 2% glicose pela cepa RY01 de *C. glabrata*. Nos tempos indicados foi quantificado (A) o consumo de glicose (●) e crescimento celular (○) no meio YPD, bem como (B) a quantidade intracelular de trealose presente nas células de levedura (□), como descrito em Materiais e Métodos.

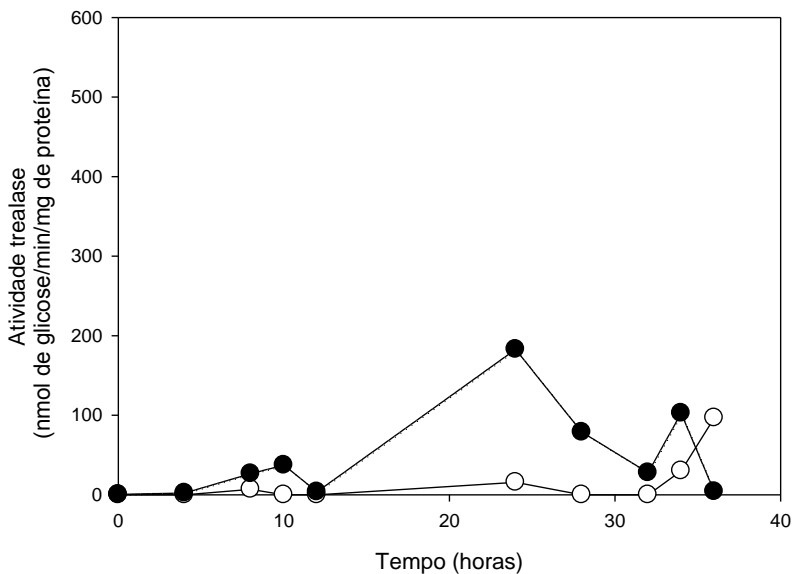


Figura 4.9. Atividade trealase durante o crescimento em 2% glicose por células da cepa RY01 de *C. glabrata*. Extratos celulares foram obtidos ao longo do crescimento das células em meio YPD, e dosada a atividade de hidrólise de trealose em pH 4,4 (—○—) e no pH 7,1 (—●—) como descrito em Material e Métodos.

crescimento em glicose (Figura 4.9) não mostrou níveis maiores desta enzima durante o consumo da glicose, sendo as atividades enzimáticas maiores na fase estacionária do crescimento.

Estes resultados nos indicavam que a trealase neutra de *C. glabrata* apresenta uma regulação diferente daquela observada em *S. cerevisiae*. Portanto passamos a analisar a ativação *in vivo* da trealase neutra em *C. glabrata* pela presença de glicose no meio de cultura. Na Figura 4.10 observa-se que na linhagem selvagem Bg14 não é possível verificar ativação da trealase neutra por glicose, já que a atividade enzimática determinada nestas células é sempre alta ao longo do ensaio (Fig. 4.10.A). Nesta mesma figura observa-se que na linhagem deletada na trealase ácida (cepa RY01, Fig. 4.10.B) ocorre uma ativação modesta, após adição de glicose às células, na atividade da trealase neutra de *C. glabrata*. Já a Figura 4.10.C mostra, como controle positivo, a significativa ativação da trealase neutra de *S. cerevisiae* pela adição de glicose.

Nossos resultados indicavam que a trealase neutra de *C. glabrata* aparentemente é regulada de forma distinta à trealase neutra de *S. cerevisiae*. De fato, tentativas de ativar a trealase neutra desta levedura pela via de fosforilação dependente de AMPc foram infrutíferas (a atividade enzimática diminuía durante a incubação, dados não mostrados), indicando que nesta levedura a regulação da atividade trealase neutra é diferente daquela observada em *S. cerevisiae*. Mesmo removendo a enzima trealase ácida dos extratos celulares de linhagens selvagens (utilizando a resina de concavalina A-Sepharose, ZILLI, 2006), ou então utilizando extratos da linhagem RY01 deletada no gene da trealase ácida, não foi observada ativação da trealase neutra pelo AMPc. Estes resultados são semelhantes aos observados em duas outras leveduras, *S. boulardii* e *C. albicans*, onde a trealase neutra aparentemente não é significativamente ativada por AMPc (ANDRADE et al., 2000; SÁNCHEZ-FRESENDA et al., 2009).

A seguir analisamos a metabolização de trealose pelas linhagens de *C. glabrata* durante um choque térmico (40°C). Com o objetivo de avaliar o efeito de um estresse por temperatura no acúmulo de trealose, consumo de glicose e crescimento celular, as cepas de *C. glabrata* Bg14 (selvagem) e RY01 (deletada para o gene da trealase ácida) foram submetidas a um choque térmico de 40°C por 60 min, e posteriormente recuperadas por 60 min a 23°C.

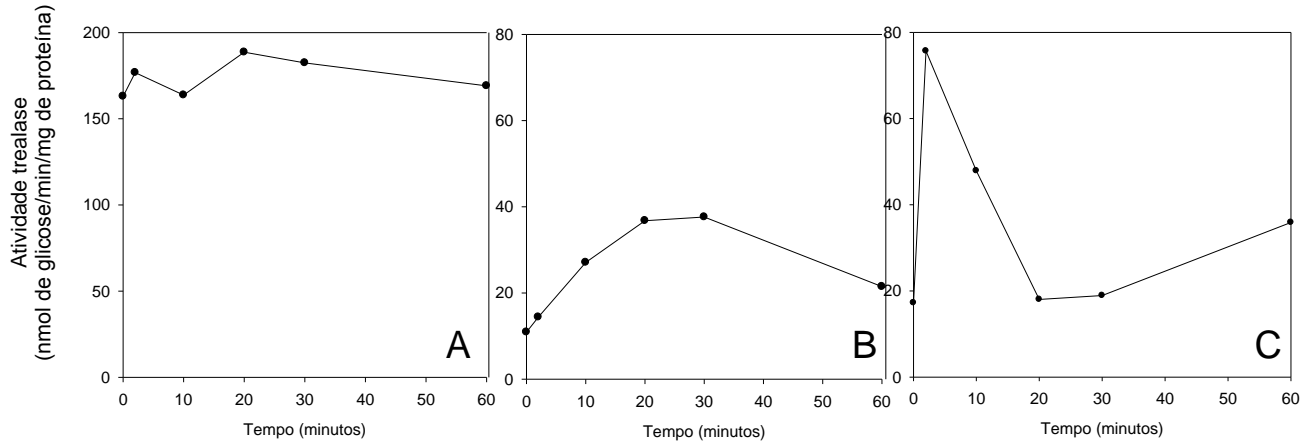


Figura 4.10. Ativação da atividade trealase in vivo por glicose. As células de *C. glabrata* da linhagem Bg14 (A), RY01 (B), ou então células de *S. cerevisiae* da linhagem S288C (C), pré-crescidas em YPD até a fase estacionária, foram incubadas na presença de 100 mM glicose. Após os tempos indicados foram obtidos extratos celulares e a atividade da trealase neutra (pH 7,1) nos extratos foi determinado como descrito em Material e Métodos.

Os resultados obtidos mostram que as células das duas cepas, RY01 e Bg14, não acumularam significativas quantidades de trealose durante o choque térmico (Figuras 4.11 e 4.12). Apenas no tempo 120 min (portanto ao final do choque térmico), após a glicose já ter sido consumida, ocorreu algum acúmulo de trealose na linhagem Bg14. Após o estresse térmico, os níveis de trealose caíram a concentrações intracelulares menores do que o obtido antes do choque térmico. Entretanto, estes resultados diferem significativamente com o reportado na literatura para a levedura *S. cerevisiae* (ZHRINGER et. al., 2000), onde ocorre um aumento significativo do conteúdo da trealose nas células após o choque térmico. Em circunstâncias de estresse de temperatura, esta levedura utiliza a trealose como um açúcar estabilizador das proteínas em seu estado nativo, aumentando a tolerância da levedura nesta condição adversa (SINGER E LINDQUIST, 1998a; 1998b).

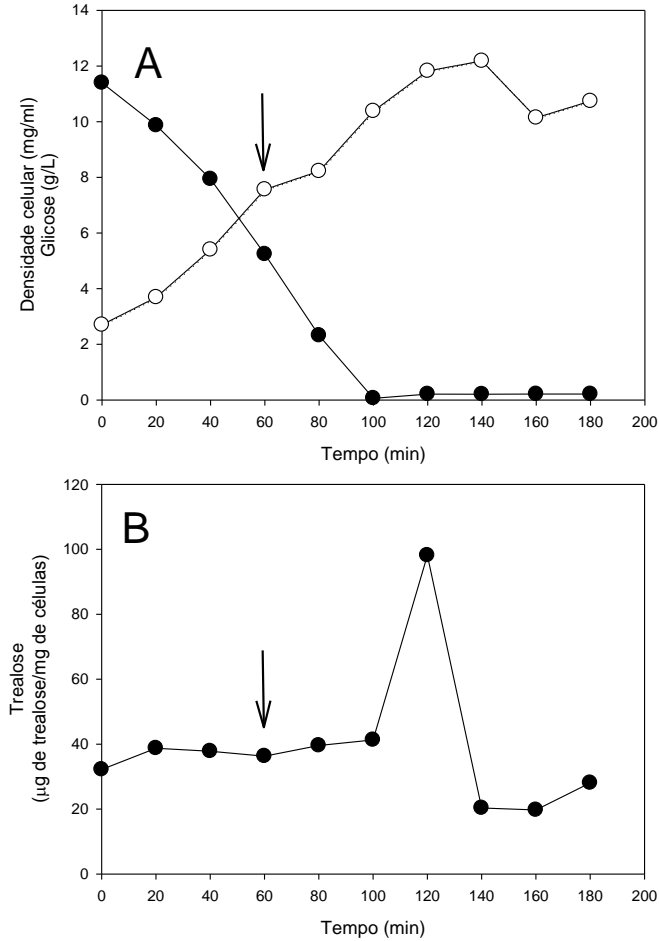


Figura 4.11. Níveis de trealose intracelular durante o choque térmico na linhagem Bg14 de *C. glabrata*. Células de fase exponencial do crescimento em YPD foram trocadas de 28°C para 40°C (setas) por 60 min., e após este tempo foram novamente incubadas a uma temperatura de 23°C por 120 min. Nos tempos indicados foi quantificado (A) o consumo de glicose (●) e crescimento celular (○), bem como (B) a quantidade intracelular de trealose presente nas células de levedura, como descrito em Materiais e Métodos.

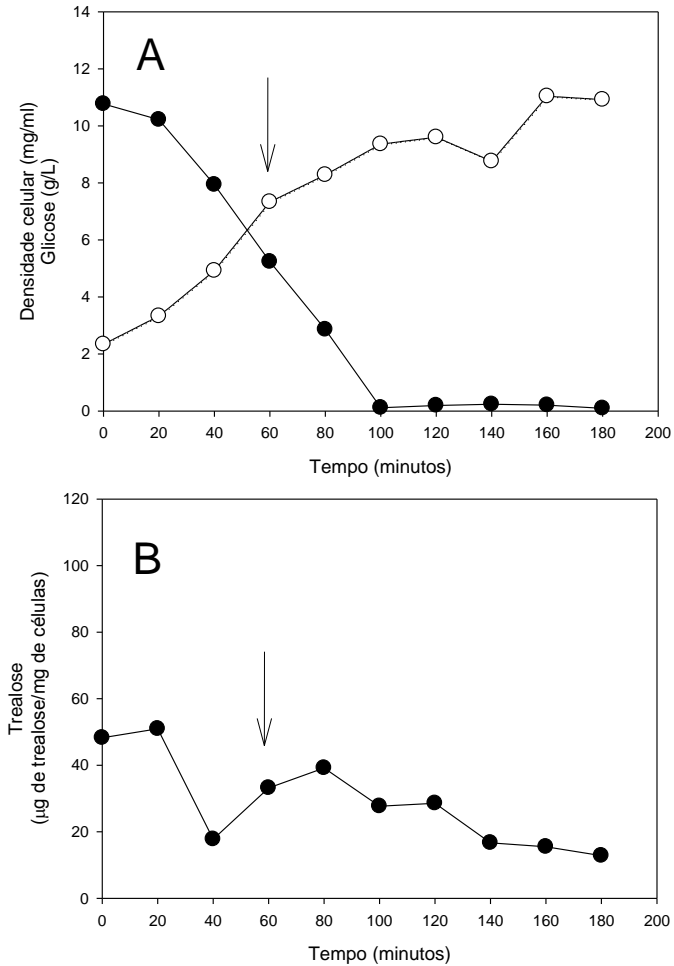


Figura 4.12. Níveis de trealose intracelular durante o choque térmico na linhagem RY01 de *C. glabrata*. Células de fase exponencial do crescimento em YPD foram trocadas de 28°C para 40°C (setas) por 60 min., e após este tempo foram novamente incubadas a uma temperatura de 23°C por 120 min. Nos tempos indicados foi quantificado (A) o consumo de glicose (●) e crescimento celular (○), bem como (B) a quantidade intracelular de trealose presente nas células de levedura, como descrito em Materiais e Métodos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados indicam que embora *C. glabrata* metabolize a trealose de forma semelhante a outras leveduras (a trealose acumulada na fase estacionária do crescimento é prontamente degradada após suprir as células com glicose), a atividade da trealase neutra nestas células aparentemente não seria responsável pela degradação da trealose uma vez que sua atividade não aumentava no período de maior degradação deste açúcar. Durante o desenvolvimento deste trabalho ficou evidente que a alta atividade da trealase ácida presente nas linhagens de *C. glabrata*, interferia na determinação da trealase neutra nestas células (baseado apenas na diferença de pH ótimo da atividade). Neste contexto a utilização de uma linhagem (RY01) deletada no gene *CgATH1*, e portanto sem atividade trealase ácida, foi fundamental para melhor caracterizar (parcialmente) a atividade trealase neutra nesta levedura, e sua possível regulação. Esta enzima não mostrou maior atividade na fase exponencial do crescimento quando a glicose está presente como fonte de carbono, nem ativação por AMPc via proteína cinase A, embora os resultados indiquem que a trealase neutra de *C. glabrata* degrada trealose na fase exponencial, pois na cepa deletada pra RY01 observou-se um queda brusca nos níveis de trealose durante esta fase do crescimento. Diferenças significativas foram também observadas na metabolização de trealose durante o estresse térmico em *C. glabrata*, quando comparado a outras leveduras. Portanto, embora seja muito próxima geneticamente à *S. cerevisiae*, e patologicamente considerada similar à *C. albicans*, a levedura *C. glabrata* merece destaque por possuir mecanismos regulatórios e comportamentos (no que diz respeito à metabolização da trealose) bastante diferenciados das demais leveduras causadoras de infecções.

Experimentos adicionais envolvendo o metabolismo da trealose em linhagens de *C. glabrata* com deleção do gene da trealase neutra (*CgNTH1*), seja em cepas selvagens ou na cepa RY01, em que o gene da trealase ácida já foi deletado, poderão melhor esclarecer o papel da trealose, e suas enzimas degradadoras, no metabolismo do patógeno emergente *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

- AISNER J. et al. *Torulopsis glabrata* infections in patients with cancer: Increasing incidence and relationships. **Am. J. Med.**, v. 61, p. 23-28, 1976.
- ANDRADE et al. Biochemical characterization of neutral trehalase activity in *Saccharomyces boulardii*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 16, p. 691-694, 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
- APP H; HOLZER H. Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17583-17588, 1989.
- ARGUELLES J.C.; GACTO M. Evidence for regulatory trehalase activity in *Candida utilis*. **Can J. Microbiol.**, v.31, p. 529-537, 1985.
- ARNOLD W.N.; MCLELLAN, M.N. Trealose and glycogen levels during the initial stages of growth of *Candida albicans*. **Physiol. Chem. Phys.**, v. 7, p. 369-380, 1975.
- BADOTTI F. et al. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v. 7, p. 4, 2008.
- BARNETT J.A.; PAYNE RW; YARROW D. Yeasts: characteristics and identification. **Cambridge University Press**, Cambridge (UK), 1983.
- BARNS S.M.; LANE D.J.; SOGIN M.L. et al. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 2250-2255, 1991.
- BELL, W. et al. Characterization of the 56 kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation.

Eur. J. Biochem., v. 209, p. 951-959, 1992.

BELL W.; SUN W.; HOHMANN SM. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 33311-33319, 1998.

BECK-SAGUE C.; JAWRIS W.R. Secular trend in epidemiology of nosocomial infection in United States, 1980-1990, Nacional Nosocomial infection surveillance system. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1247-1251, 1993.

BERROUANE Y.F.; HERWALDT LA; PFELLER MA Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial infections in a university hospital. **J. Clin. Microbol.**, v. 37, p. 531-537, 1999.

BIALKOVÁ A.; SUBIK J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, v. 51, p. 3-20, 2006.

BLAZQUEZ M.A. et al. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. **FEBS Lett.**, v. 329, p. 51-54, 1993.

BOUCHARA J.P. et al. In vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 977-984, 2000.

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.

BRIN, M. Transketolase: Clinical aspects. **Methods Enzymol.**, v. 9, p. 506-514, 1966.

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.

BRUN S. et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, p. 1788-

1796, 2004.

CABIB E; LELOIR L. The biosynthesis of trehalose-phosphate. **J. Biol. Chem.**, v. 231, p. 259-275, 1958.

CANDY, D.J.; KILBY, B.A. Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust. **Nature**, v. 183, p. 1584-1595, 1958.

CARPENTER, J.F.; CROWE, J.F. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v. 28, p. 3916-3922, 1989.

CARRILLO D. et al. Activation of cytoplasmic trehalase by cyclic-AMP-dependent and cyclic-AMP-independent signalling pathways in the yeast *Candida utilis*. **Microbiology**, v. 141, p. 679-686, 1995.

CHEN Q.; HADDAD G.G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 3125-3129, 2004.

CROSS E.W.; PARK S.; PERLIN D.S. Cross resistance of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to over-the-counter azoles used in treatment of vaginitis. **Micro. Drug. Rest.**, v. 6, p. 155-161, 2000.

CROWE J.; CROWE L.; CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 209-217, 1984.

DEBERNARDIS, F. P. et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 466-471, 1996.

DEFONTAINE A et al. In vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 663-670, 1999.

DELLAMORA-ORTIZ G.M. et al. Activity and stability of a

Rhizomucor miehei lipase in hydrophobic media. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 251, p. 205-214, 1986

DE VIRGILIO C. et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 179-186, 1994.

DIETRICH F.S. et al. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Science**, v. 304, p. 304-307, 2004.

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.

DUJON et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, p. 35-44, 2004.

ECK R. et al. A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. **Microbiology**, 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.

ELBEIN A.D et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, p. 17-27, 2003.

EMSLEY, J. The beetle cocoon that was manna for Moses: Molecule of the month: John Emsley looks at trehalose. **The Independent**, Londres, domingo, 22 de abril 1996. Disponível em:< <http://www.independent.co.uk/news/science/the-beetle-cocoon-that-was-manna-for-moses-1306263.html>> Acesso em janeiro de 2011.

FAIRBAIRN, D.; PASSEY, R.F. Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*.

Exp. Parasitol., v. 6, p. 566-574, 1957.

FAIRBAIRN, D. Glucose, trehalose and glycogen in *Porrocaecum decipiens* larvae. **Nature**, v. 181, p. 1593-1594, 1958.

FENN, J. P. et al. Comparison of four methodologies for rapid and cost-effective identification of *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3387-3389, 1999.

FIDEL P.L.; SOBEL J.D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 335-348, 1996.

FIDEL P.L.; VAZQUEZ J.A.; SOBEL J.D. *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis and clinical diseases with comparison with *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 80-96, 1999.

FRANÇOIS J.; PARROU J.L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 125-145, 2001.

FREYDIERE A.M. et al. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3602-3605, 2002.

FREYDIERE A.M.; ROBERT R; PLOTON C. Rapid Identification of *Candida glabrata* with a New Commercial Test, GLABRATA RTT. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3861-3863, 2003.

HAZEN K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin. Micro. Rev.**, v. 8, p. 462-478, 1995.

GADD, G. M., CHALMERS, K. REED, R. H. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevesiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 48, p. 249-254, 1987.

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. 2693-2700, 2000.

HICKEY WF; SOMMERVILLE LH; SCHOEN FJ. Disseminated

Candida glabrata: report of a uniquely severe infection and a literature review. **Am. J. Clin. Pathol.**, p. 80, v. 724–727, 1983.

HITCHCOCK C.A. et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1962–1965, 1993.

KAO A.S. et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of population-based active surveillance. **Clin. Inf. Dis.**, v. 29, p. 1164–1170, 1999.

KATAOKA T. et al. Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. **Cell**, v. 40, p. 19–26, 1985.

KAUR R. et al. A yeast by no other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Cur. Opin. Microl.**, v. 8, p. 378–384, 2005.

KELLIS M.; BIRREN B.W.; LANDER E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617–624, 2004.

KOCKOVÁ-KRATOCHVILOVÁ A. Taxonomy of yeast and yeast like microorganisms. (In Slovak) **Alfa**, Bratislava. (1990).

KOMSHIAN S.V.; UWAYDAH A.K.; SOBEL J.D. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Rev. Infect. Dis.**, v. 11, p. 379–390, 1989.

KOPP M; MULLER H; HOLZER H Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 4766–4774, 1993.

KOPP M; NWAKA S; HOLZER H. Corrected sequence of yeast neutral trehalase-encoding gene (NTH1): biological implication. **Gene**, v. 150, p. 403–404, 1994.

KOSMAS S. A. et al. Isolation and characterization of stress related Heat shock protein calmodulin binding gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v. 223, p. 329–339, 2006.

KREMERY V. et al. Nosocomial breakthrough fungemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of etiology risk factors and outcome. **J. Antigen Agen.**, v. 41, p. 373-380, 1998.

KURZMANN C.P.; FELL J.W. (eds) **The yeasts: a taxonomic study**, 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LARONE, D. H. **Medically important fungi, a guide to identification**. 4. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2002.

LONDESBOROUGH J.; VARIMO K. Characterization of two trehalases in baker's yeast. **Biochem. J.**, v. 219, p. 511-518, 1984.

LOPEZ J. et al. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1172-1174, 2001.

LOPES R.G. **Clonagem, expressão heteróloga e obtenção de mutantes da trealase ácida de *Candida glabrata***, 2010, 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LUCES TM; PAFF H.J. Characteristics of trehalase in *Candida tropicalis*. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 18, p. 323-335, 1952.

MARICHAL, P. H. et al. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 2229-2237, 1997.

MAQUELIN, K. et al. Rapid identification of *Candida* species by confocal Raman microspectroscopy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 594-600, 2002.

MARTIN, M.C. et al. Role of trehalose in the spores of *Streptomyces*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 35, p. 49-54, 1986.

MEYER S.A.; AHEARN D.G.; YARROW D.G. **The yeasts: a**

taxonomic study. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1984.

MIYAZAKI H et al. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1695-1701, 1998.

MITTENBUHLER K. A.; HOLZER H. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 8537-8543, 1988.

MURPHY, T.A.; WYATT, G.R. The enzymes of glycogen and trehalose and synthesis in silk moth fat body. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 1500-1508, 1965.

NEVES, M.J.; FRANÇOIS, J. On the mechanism by which heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 288, p. 859-864, 1992.

NGUYEN, M. T.; WEISS; LABARRE. Orally administered amphotericin B in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients caused by azole-resistant *Candida albicans*. **AIDS**, v. 10, p. 1745-1747, 1996.

NOUBHANI A. et al. Reconstitution of ethanolic fermentation in permeabilized spheroplasts of wild-type and trehalose-6-phosphate synthase mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 4566-4576, 2000.

NUCCI M.; COLOMBO A.L. Emergence of resistance in *Candida* neutropenic patients. **Braz. J. Inf. Dis.**, v. 6, p. 124-128, 2002.

NWAKA S; KOPP M; HOLZER H Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 10193-10198, 1995.

NWAKA S.; MECHLER B; HOLZER H. Detection of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Lett.**, v. 386, p. 235-238, 1996.

NWAKA S; HOLZER H (1998) Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevesiae*. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 58: 197-237.

PASQUALOTTO et al. Take control over your fluconazole prescriptions: The growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 29, p. 898-899, 2008.

PFALLER, M. A. et al. 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 through 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.

PATTERSON T.F. Advances and challenges in management of invasive mycoses. **Lancet.**, v. 366, p. 1013-1025, 2005.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA H.; et al. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 202-205, 1999.

PIENS, M. A. et al Routine use of a one minute trehalase and maltase test for the identification of *Candida glabrata* in four laboratories. **J. Clin. Pathol.**, v. 56, p. 687-689, 2003.

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. 1422-1424, 1994.

RANGEL-FRAUSTO M.S. et al. National epidemiology of micoses survey (NEMIS): A variation in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal

intensive care units. **Clin. Inf. Dis.**, v. 29, p. 253-258, 1999.

RICHARDSON M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56. P. 5–11, 2005.

ROLLAND, F. et al. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 348–358, 2000.

ROTH, R. E. SUSSMANN, M. Trehalose synthesis in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 122, p. 225-231, 1966.

SÁNCHEZ-FRESNEDA R. et al. On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase activities. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 383, 98-102, 2009.

SANGLARD D. et al. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 2753-2765, 1999.

SANGLARD D.; ISCHER F.; BILLE J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, p. 1174-1183, 2001.

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.

SINGER M.A.; LINDQUIST S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. **Trends Biotech.**, v. 16, p. 460-468, 1998a.

SINGER M. A.; LINDGUIST S. Multiple effects of trehalose on protein

folding in vitro and in vivo. **Mol. Cell**, v. 1, p. 639-648, 1998b.

SCHLUEPMANN H. et al. Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings is due to trehalose-6-Phosphate accumulation. **Plant Physiol.**, v. 135, 879–890, 2004.

SOBEL J.D. Management of infections caused by *Candida glabrata*. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 2, p. 424-428, 2000.

SONG J.L. et al. The *Candida albicans* lanosterol 14-demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1136-1144, 2004.

STAMBUK, B. U. et al. A dependable method for the synthesis of [14C]trehalose. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 150-153, 1993.

TAKAYAMA, K.; ARMSTRONG, E.L. Isolation, characterization and function of 6-mycolyl-60acetyltrehalose in the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 15, p. 441-446, 1976.

THEVELEIN, J.M. The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevesiae*. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 62, p. 109-130, 1992.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p. 42-59, 1984.

THEVELEIN et al. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. **Enz. Micr. Tech.**, v. 26, p. 819-825, 2000.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochem. J.**, v. 62, p. 177-182, 1956.

TODA, T. et al. Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein

kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 1371-1377, 1987a.

TODA, T. et al. Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. **Cell**, v. 50, p. 277-287, 1987b.

UNO I.; MATSUMOTO K.; ISHIKAWA T. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 10867-10872, 1983

VALLE E. et al., Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification. **Eur. J. Biochem.**, v. 154, p. 247-251, 1986.

VANDEN-BOSSCHE H. et al. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 2602-2610, 1992.

VANDEN BOSSCHE H. et al. Hypothesis on the molecular basis of antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles. **Biochem. Soc. Trans.** v. 11, p. 665-667, 1983.

VAZQUEZ, J. A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 421-426, 1998.

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. 621-626, 1999.

WIEMKEN A.; SCHELLENBERG M. Does a cyclic AMP-dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalase from the cytosol into the vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*? **FEBS Lett.**, v. 150, p. 329-331, 1982.

WILLINGER B. et al. Comparison of a New Commercial Test, GLABRATA RTT, with a Dipstick Test for Rapid Identification of *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 499-501, 2005.

WIEMKEN A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve

carbohydrate. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 58, p. 209-217, 1990.

WINGARD, J. R. et al. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1847–1849, 1993.

WOLFE K.H.; LOHAN A.J. Sequence around the centromere of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II: similarity of CEN2 to CEN4. **Yeast**, v. 10 (Suppl A), p. S41–46, 1994.

WONG S.; BUTLER G.; WOLFE K.H. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiscomycete yeasts. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 9272-9277, 2002.

WYATT, G.R.; KALF, G.F. The chemistry of insect hemolymph. Trehalose and other carbohydrates. **J. Gen. Physiol.**, v. 40, p. 833-846, 1957.

YOSHIDA Y; AOYAMA Y. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-450 purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 229-235, 1987.

ZHRINGER H., HOLZER H., NWAKA S. Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. **Eur. J. Biochem.**, v. 255, p. 544–551, 1998.

ZHRINGER H., THEVELEIN J. M., NWAKA S. Induction of neutral trehalase Nth1p by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 397–406, 2000.

ZILLI, D. M. W. **Catabolismo da trealose extracelular e caracterização bioquímica da trealase ácida de *Candida glabrata***, 2006, 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.