

FERNANDO RUY

**ESTUDO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE
LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA PATOLÓGICA: determinação
da contribuição das diferentes vias de transporte
de elétrons para o crescimento celular**

CAMPINAS

2007

FERNANDO RUY

**ESTUDO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE
LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA PATOLÓGICA: determinação
da contribuição das diferentes vias de transporte de
elétrons para o crescimento celular**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
área de concentração Ciências Biomédicas*

ORIENTADOR (A): PROF^a. DR^a. ALÍCIA JULIANA KOWALTOWSKI

CAMPINAS

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R944e	Ruy, Fernando Estudo da bioenergética mitocondrial de leveduras de importância patológica: determinação da contribuição das diferentes vias de transporte de elétrons para o crescimento celular / Fernando Ruy. Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientador: Alicia Juliana Kowaltowski Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Candida albicans. I. Kowltowski, Alicia Juliana. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês: “Studies on mitochondrial bioenergetics in pathogenic fungi: determination of the contribution of different electron transport pathways toward cell growth”

Keywords: • Candida albican

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski

Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia

Profa. Dra. Claudia Barbosa Ladeira de Campos

Profa Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Data da defesa: 02-03-2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alicia Juliana Kowaltowski

Membros:

1. Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski –



2. Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia –



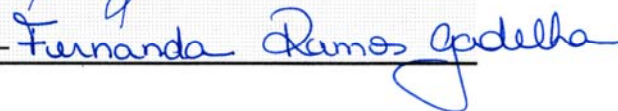
3. Profa. Dra. Claudia Barbosa Ladeira de Campos –



4. Profa. Dra. Rosana Almada Bassani –



5. Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha –



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/03/2007

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética do
Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio irrestrito e incondicional.

À professora Alicia pela excelente orientação, dedicação e rigor científico.

Ao professor Anibal por todos os ensinamentos e seu esforço em proporcionar material e ambiente adequado para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FAPESP, CNPq e CAPES.

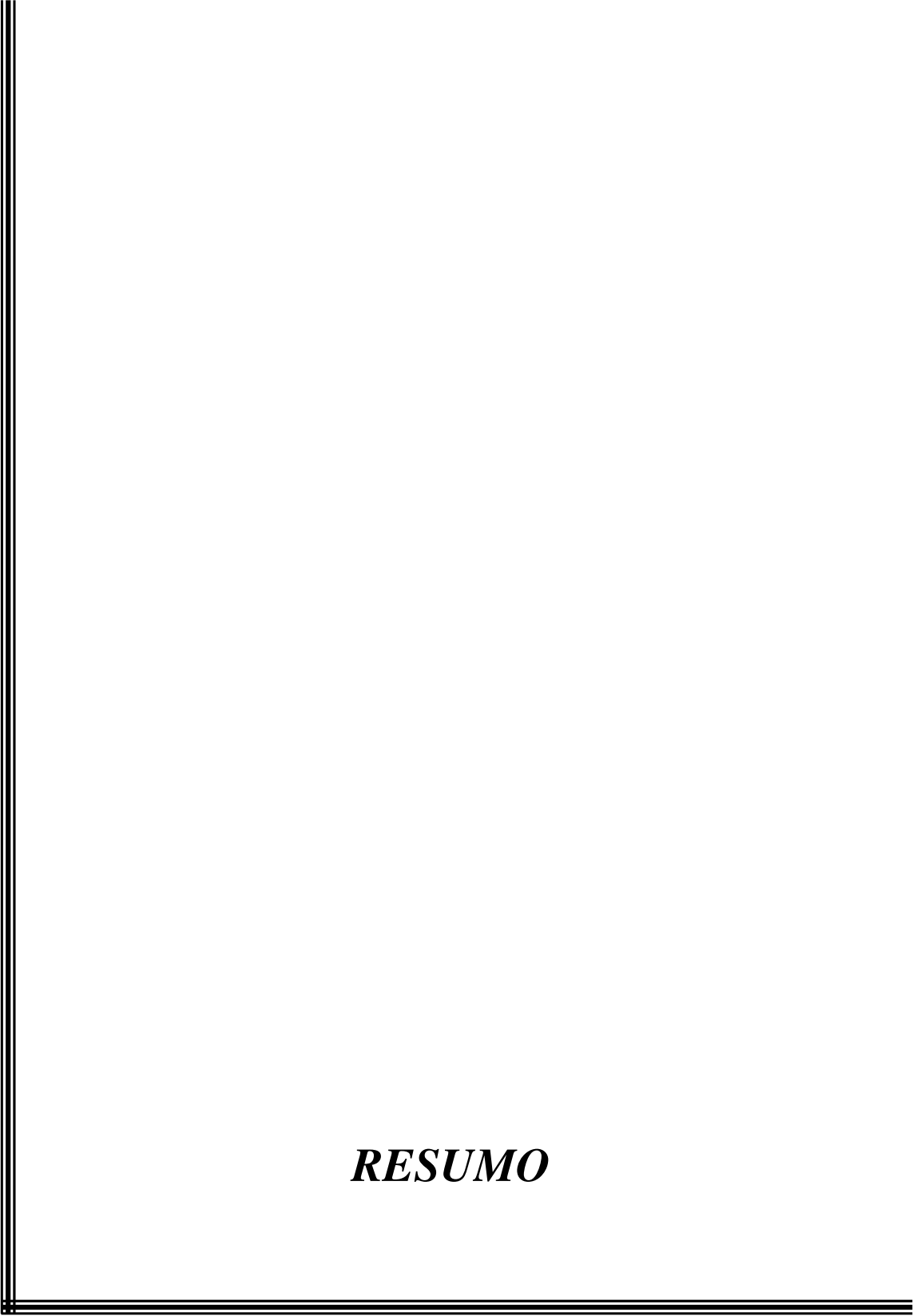
Aos amigos do laboratório Anna Maria, Ângela, Bruno, Camila, Catarina, Daniela, Edilene, Elisangela, Evelise, Renata, Karina, Sandra, Juliana, Giovanna, Mariana, Natália, Márcia, Jesus, Endrigo (*in memoriam*), Luciane e Kívia.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>ix</i>
ABSTRACT.....	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	13
1.1- <i>Candida albicans</i> e sua importância clínica.....	14
1.2- A cadeia respiratória das leveduras.....	15
1.2.1- A cadeia clássica (CRC).....	16
1.2.3- A oxidase alternativa (AOX).....	17
1.2.4- A proteína desacopladora (UCP).....	19
1.2.5- A cadeia respiratória paralela (PAR).....	21
1.3- A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria.....	22
1.4- Defesas antioxidantes mitocondriais.....	23
1.5- Estresse Térmico.....	26
2- OBJETIVOS.....	27
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1- Origem e preparo do material biológico e reagentes.....	30
3.2- Manutenção das células de <i>C. albicans</i>.....	30
3.3- Preparação do pré-inoculo.....	30
3.4- Preparação do inoculo.....	30
3.5- Preparo de esferoplastos de <i>C. albicans</i>.....	31
3.6- Isolamento de mitocôndrias.....	31

3.7- Dosagem de proteínas.....	31
3.8- Obtenção das curvas de crescimento.....	32
3.9- Medida do consumo de O ₂	32
3.10- Quantificação da liberação de EROs mitocôndria.....	33
3.11- Quantificação dos níveis de glutathione oxidada (GSSG) e reduzida (GSH).39.....	33
3.12- Análises estatísticas.....	34
4- RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES.....	35
4.1- A cadeia transportadora de elétrons de <i>C. albicans</i>	36
4.2- Determinação da importância das diferentes vias de redução de oxigênio para a vitalidade da <i>C. albicans</i>	37
4.3- Efeito da inibição das vias de redução de O ₂ sobre a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	45
4.4- Determinação dos níveis de glutathione nas células tratadas com os inibidores do transporte de elétrons.....	46
4.5- Estudo da cadeia respiratória de <i>Cândida albicans</i> sobre condições de estresse térmico.....	47
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÕES.....	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8- APÊNDICE.....	67

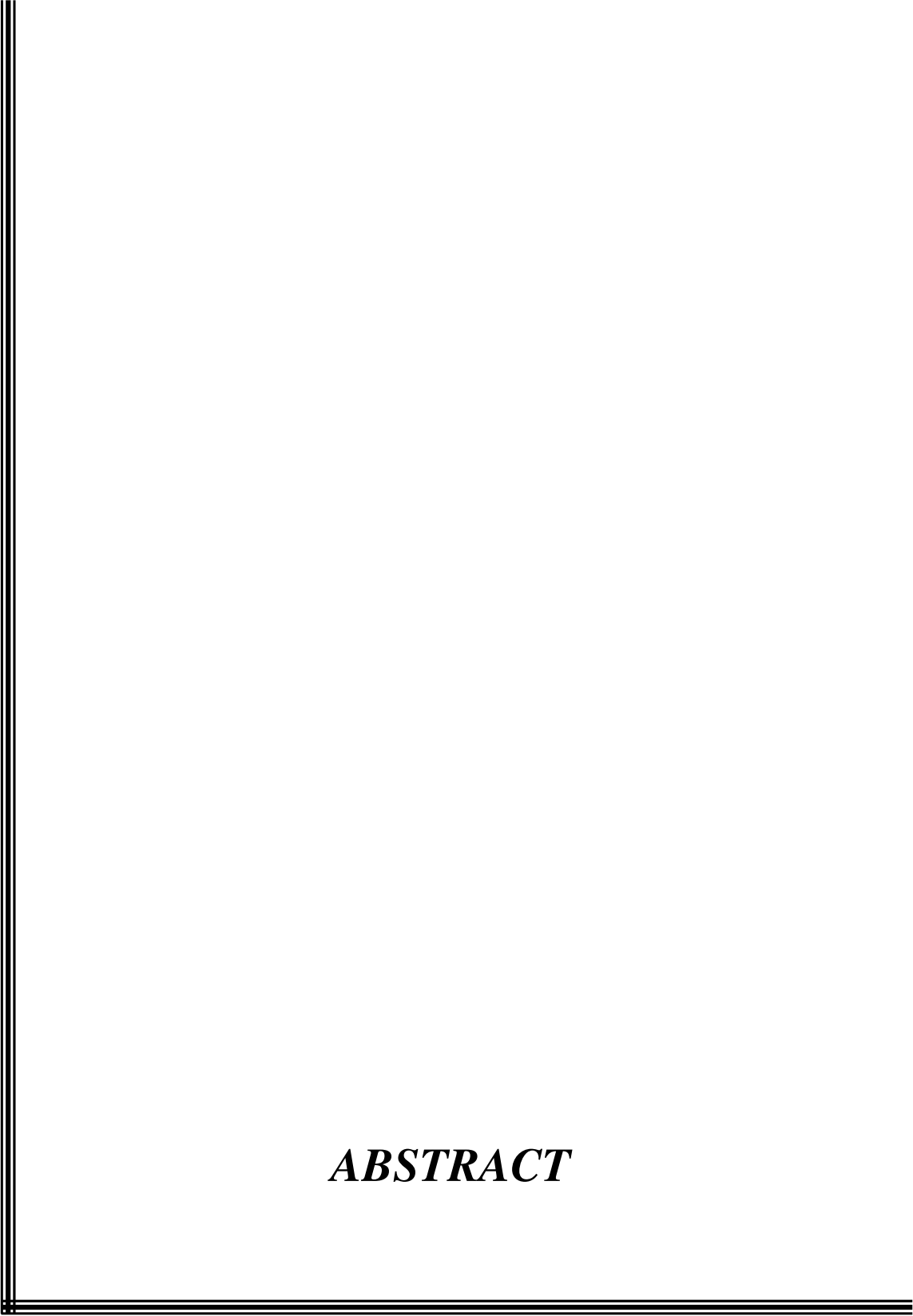
LISTA DE ABREVIATURAS

AA	antimicina A
ADP	adenosina-5'-difosfato
AOX	oxidase alternativa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BHAM	ácido benzohidroxâmico
BSA	albumina bovina
CRC	cadeia respiratória clássica principal
DTNB	5,5'-ditiobis-[ácido 2-nitrobenzóico]
DTT	ditiotreitól
EROs	espécies reativas de oxigênio
GSH	glutathione (forma reduzida)
GSSG	glutathione (forma oxidada)
GPx	glutathione peroxidase
H₂DCFH	2,7 diacetato de diclorofluoresceína
Hepes	ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-estassulfônico])
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PAR	cadeia respiratória paralela
UCP	proteína desacopladora mitocondrial
$\Delta\mu\text{H}^+$	gradiente eletroquímico de prótons



RESUMO

A levedura *Candida albicans* é um importante patógeno em humanos. A principal característica deste microorganismo é a sua habilidade de sobreviver em diferentes ambientes do hospedeiro, com diferentes tensões de oxigênio. Acredita-se que esta flexibilidade deve-se à expressão de vias alternativas de redução do oxigênio e ao controle do fluxo de elétrons entre elas e a cadeia respiratória clássica. A presença destas vias pode ainda estar relacionada à alta resistência do fungo a drogas, uma vez que a inibição de uma delas pode ser suprida pela atividade das outras. Neste sentido, um entendimento detalhado do transporte de elétrons destas leveduras torna-se imprescindível. Neste trabalho, após a confirmação da existência de três vias de transporte de elétrons nas mitocôndrias de *C. albicans*: a cadeia clássica (CRC), uma via paralela (PAR) e a oxidase alternativa (AOX), avaliou-se a importância de cada uma delas para o crescimento celular. Assim, foram feitos tratamentos com compostos que possuem efeito inibitório sobre pontos específicos a cadeia respiratória da levedura, e avaliações de curvas de crescimento dos organismos. A antimicina e o KCN, que inibem os Complexos III e IV da CRC, respectivamente, preveniram totalmente o crescimento quando comparadas à cultura controle. O BHAM, um inibidor da AOX, também promoveu a inibição da proliferação celular. A presença de rotenona, um inibidor do Complexo I da CRC, não inibiu completamente o crescimento da levedura. Estes experimentos foram então correlacionados com medidas de consumo de oxigênio nas suspensões mitocondrial e celular, onde nós observamos que a rotenona e o BHAM foram capazes de promover apenas inibições parciais da respiração. As concentrações de antimicina e KCN que promoveram inibições respiratórias parciais proporcionaram efeitos distintos sobre o crescimento. Enquanto a antimicina preveniu totalmente o crescimento, o KCN não apresentou efeito inibitório. Avaliamos ainda os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutatona oxidada (GSSG) nas células incubadas na presença dos inibidores respiratórios. Os níveis de EROs nas mitocôndrias tratadas com antimicina foram significativamente aumentados em relação aos outros grupos. Observamos também um aumento de GSSG nas células incubadas com antimicina e BHAM. Nossas descobertas experimentais sugerem que as inibições do Complexo III da CRC e a AOX previnem o crescimento da levedura por promover estresse oxidativo de origem mitocondrial.



ABSTRACT

Candida albicans is an important pathogen in humans. A crucial feature of this microorganism is its ability to survive in different environments within the host with distinct oxygen tensions. It is believed that this flexibility is due the expression of alternative oxygen reduction pathways and the control of electron flux between them and the classical respiratory chain. The presence of these pathways may also be related to the high resistance these fungi present to drugs, since the inhibition of one electron transport pathway can be compensated by the activity of the others. In this study we confirm the presence of three electron transport pathways in *Candida albicans*: the classical respiratory chain (CRC), a parallel chain (PAR) and an alternative oxidase (AOX). We also evaluated the contribution of each pathway toward yeast growth. To do so, we measured cellular proliferation in the absence and presence of electron transport inhibitors. Antimycin A and KCN, which inhibit Complexes III and IV, respectively, totally prevented cellular growth. BHAM, an AOX inhibitor, also promoted inhibition of yeast growth. Surprisingly, the presence of rotenone, an inhibitor of respiratory Complex I, inhibited yeast growth only partially. These results were then correlated with oxygen uptake in mitochondrial and cell suspensions, which revealed that rotenone and BHAM promote only partial respiratory inhibitions. Concentrations of antimycin and KCN which promoted partial respiratory inhibition had distinct effects on growth. While antimycin totally prevented cell proliferation, KCN did not. We also evaluated the levels of reactive species of oxygen (ROS) and oxidized glutathione in the cells incubated in the presence of respiratory inhibitors. The levels of ROS in antimycin-treated cells were significantly higher than in the other groups. Finally, we observed an increase of oxidized glutathione in cells incubated in the presence of antimycin and BHAM. These experimental findings suggest that inhibitions of complex III of the CRC and AOX prevent *Candida albicans* growth by promoting oxidative stress, indicating the importance of these pathways to ensure yeast viability.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Candida albicans* e sua importância clínica

O aumento da incidência de infecções por fungos unicelulares tem impulsionado diversas pesquisas acerca da fisiologia destes organismos a fim de combatê-los (Anaissie et al., 1989). Dentre estas leveduras, o gênero *Candida* representa a maior causa das infecções fúngicas nos seres humanos (Segal, 2005) e a *C. albicans* é responsável por mais de 50% destes casos.

Pacientes oncológicos são altamente suscetíveis a infecções fúngicas devido à deficiência imune, sendo que as leveduras do gênero *Candida*, particularmente a *C. albicans* e *C. tropicalis*, são responsáveis por 46% destes casos (Carlisle et al., 1993). Além disso, estas infecções têm se tornado a maior causa de mortalidade entre outros indivíduos imunossuprimidos, sobretudo os pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Georgopapadakou e Tkacz, 1995; Rex et al., 1993; Vanden Bossche *et al.*, 1994).

Até a década de 1970, a anfotericina B era a única droga disponível para o combate destas infecções. Porém, a sua fórmula convencional é pouco tolerada, apresentando alto risco de comprometimento renal, principalmente quando ministrada concomitantemente com outras drogas nefrotóxicas, como quimioterápicos (Cesaro et al., 1993). Contudo, ela ainda permanece como a droga de escolha para pacientes com confirmação de infecção fúngica sistêmica (Rocco et al., 2000). O mecanismo de ação da anfotericina B foi elucidado por Elewski em 1993. O composto liga-se ao ergosterol da membrana celular do fungo, causando rompimento celular e conseqüente extravasamento dos seus componentes.

A partir dos anos 80 o surgimento dos imidazólicos e triazólicos representou um grande avanço para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas (BODEY, 1992). Entretanto, o uso extensivo destes quimioterápicos, em especial o fluconazol, resultou num aumento do número de relatos de casos de resistência (Ghannoum e Rice, 1999). Nos fungos estes compostos interagem com o citocromo P-450, enzima responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (Elewski e Ohio, 1993; Christine e Terrel, 1999), inibindo a síntese deste composto. Devido à enzima citocromo P-450 dos mamíferos estar

envolvida na síntese de importantes esteróides como a testosterona e o cortisol, as drogas com uma afinidade por esta enzima podem estar associadas à toxicidade. Neste sentido, o desenvolvimento de novos antifúngicos e novos alvos biológicos para suas ações vem ganhando interesse (Wenisch et al., 1997).

Estudos conduzidos recentemente revelaram que uma família de peptídeos secretados na saliva, as estatinas, apresenta atividade contra fungos patogênicos, incluindo a *Candida albicans* (Oppenheim et al., 1998; Rayhan et al., 1992). Posteriormente, demonstrou-se que um destes peptídeos, a estatina 5, liga-se a receptores da membrana plasmática, sendo captada pelas células e associando-se intracelularmente às mitocôndrias. Na organela, estes peptídeos provocam uma série de eventos citotóxicos, como diminuição da atividade respiratória, formação de espécies reativas de oxigênio e depleção do ATP intracelular, (Helmerhorst et al., 2001). O composto acarreta ainda perda de volume celular e interrupção do ciclo de vida do organismo (Kavanagh e Dowd, 2004). Este exemplo ilustra como moléculas de ação mitocondrial possuem acentuado efeito antifúngico. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a função mitocondrial pode afetar a sobrevivência destas células faz-se necessária, e pode evidenciar novos alvos para a ação de drogas.

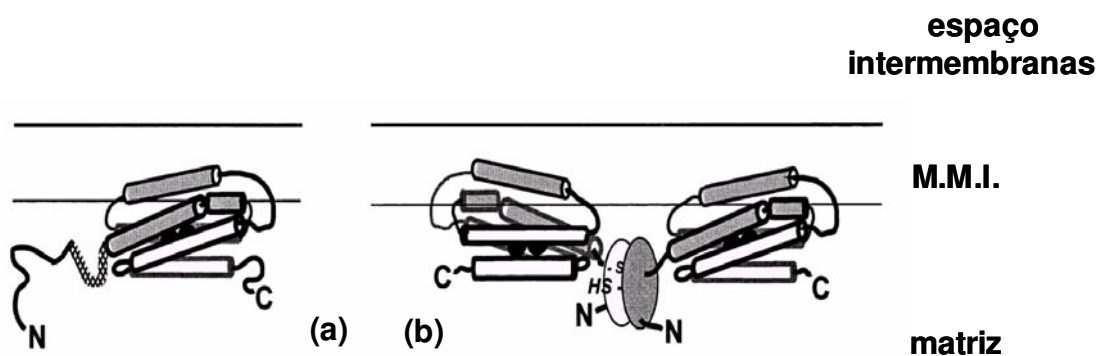
1.2- A cadeia respiratória das leveduras

Enquanto nos organismos vertebrados a cadeia respiratória exibe uma organização bem determinada e praticamente linear no transporte de elétrons, nas leveduras este transporte ocorre por vias mais complexas e flexíveis, apresentando características bastante peculiares e ainda pouco conhecidas. (Guérin e Camougrand, 1994; Milani et al., 2001, ver Esquema 1). A *C. parapsilosis*, por exemplo, possui três vias respiratórias: a cadeia respiratória clássica (via dos citocromos - CRC), uma via oxidativa “alternativa” (a oxidase alternativa - AOX) (Guérin e Camougrand, 1986) e uma cadeia paralela (PAR) (Guérin e Camougrand, 1994). A presença destas vias confere a estes organismos uma alta resistência às drogas, haja vista que a inibição de uma delas pode ser suprida pela atividade das outras.

complexos, as plantas e os fungos expressam ainda NADH desidrogenases alternativas (interna e externa, voltadas para a matriz mitocondrial e citosol, respectivamente). Estas desidrogenases não transportam prótons e apresentam uma sensibilidade apenas parcial à rotenona.

1.2.3- A oxidase alternativa (AOX)

Outro ponto de convergência entre a cadeia transportadora de elétrons dos dois reinos é a presença de uma via alternativa, a AOX, que se ramifica da cadeia principal ao nível da ubiquinona, reduzindo oxigênio à água e evitando o bombeamento de H^+ da matriz para o espaço intermembranas. Assim, o fluxo de elétrons através da proteína não é acoplado à síntese de ATP. Análises laboratoriais identificaram que a AOX das leveduras é sensível a ácidos hidroxâmicos, como o ácido benzohidroxâmico (BHAM) e o ácido salcilhidroxâmico (SHAM) (Siedow et al., 1995). Por outro lado, a AOX é insensível a cianeto, azidas, monóxido de carbono e óxido nítrico, que inibem a citocromo *c* oxidase, assim como nas mitocôndrias vegetais. Enquanto a inibição da AOX dos fungos é bastante similar à das plantas, a regulação e estrutura parecem menos conservadas entre os dois reinos. A AOX dos vegetais possui regulação positiva por piruvato, enquanto o composto não apresenta efeito nas leveduras (Joseph-Horne et al., 2000; Umbach et al., 2000). No entanto, a AOX fúngica pode ser estimulada por nucleotídeos de purina, que também regulam a enzima das plantas (Siedow e Umbach, 2000). A regulação da AOX nas plantas apresenta uma complexidade adicional: a existência de uma forma monomérica (alta atividade) e uma dimérica (baixa atividade) (Esquema 2). O dímero é estabilizado através da formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas terminais dos monômeros. Como resultado, redutores tiólicos como o ditiotreitól ativam a enzima (Vanlerberghe et al., 1995). Na maioria dos fungos, a proteína não apresenta estas cisteínas identificadas em plantas, embora a proteína já tenha sido observada na forma dimérica (Joseph-Horne et al., 1998). Cada monômero da proteína possui duas porções hidrofóbicas que ligam a proteína à bicamada lipídica e um sítio ativo formado por um centro diférrico ligado a quatro hélices empacotadas que constituem a região hidrofílica da enzima (Berthold et al., 2000).



Esquema 2- Representação esquemática da AOX de fungos (a) e plantas (b) segundo Siedow e Umbach (2000). Cada monômero possui duas porções hidrofóbicas que ligam a proteína à camada lipídica (cilindros superiores), um sítio ativo formado por um centro diférrico (círculos negros no interior da cavidade formada pelas hélices) e quatro hélices empacotadas (cilindros inferiores).

Em *C. albicans* foram identificados dois genes (*AOX1a* e *AOX1b*) que codificam duas proteínas de 379 e 365 aminoácidos, respectivamente, correspondendo à AOX (Huh e Kang, 1999, 2001). O gene *AOX1a* é expresso constitutivamente, enquanto a expressão do *AOX1b* é dependente da fase de crescimento e pode ser induzido por tratamentos com inibidores do transporte de elétrons como antimicina A e KCN. A expressão do *AOX1b* pode ainda ser aumentada quando as células são cultivadas em meio contendo fonte de carbono não fermentável, como o glicerol ou etanol (Huh e Kang, 1999; 2001). Posteriormente, foi demonstrado que a indução da AOX não afeta a expressão dos outros complexos respiratórios nas mitocôndrias de *C. albicans* (Helmerhorst et al. 2005).

A co-expressão das diferentes vias respiratórias pode permitir ao organismo uma dissociação entre os processos de síntese de ATP e consumo de oxigênio mitocondrial. Isso permite regular os níveis de oxigênio do microambiente e de da coenzima Q mitocondrial, uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Nicholls e Ferguson, 2001). De fato, foi observado anteriormente que a inibição da AOX em mitocôndrias vegetais está associada à formação de EROs

(Popov et al., 1997). Corroborando com estas constatações experimentais, Vanlerberghe et al. (2006) verificaram um aumento das defesas antioxidantes em folhas e culturas celulares de tabaco onde a expressão da AOX foi silenciada. Além disso, foi descrito também que a inibição da proteína em plantas promove morte celular programada (Vanlerberghe et al., 2002).

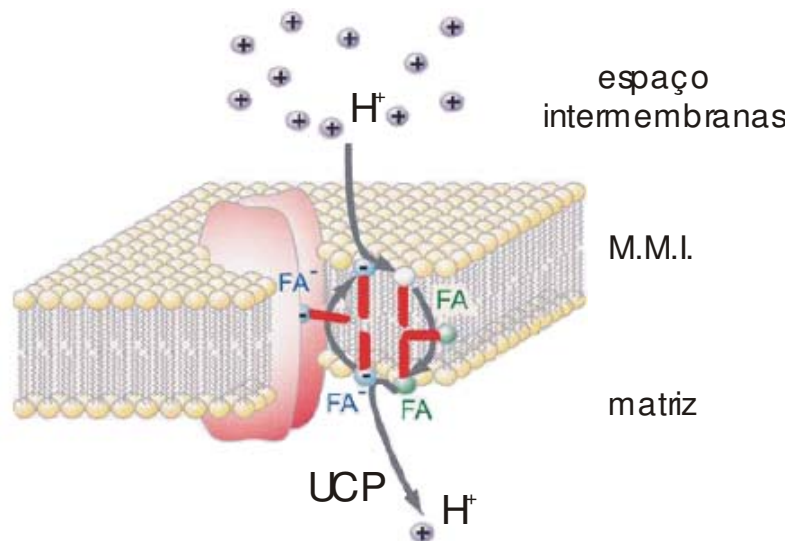
Do ponto de vista bioenergético, é importante ressaltar que o fluxo de elétrons através da AOX não é acoplado ao bombeamento de H^+ , sendo a via menos eficiente na conservação de energia. Nesta rota de fluxo de elétrons, o bombeamento de H^+ é mantido apenas pelo complexo I (ver esquema 1), enquanto que pela via clássica dos citocromos o bombeamento é mantido pelos complexos I, III, IV.

A expressão da AOX nas leveduras patológicas pode ser clinicamente importante. Durante a infecção fúngica, os neutrófilos e macrófagos mononucleares reduzem o O_2 a ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Yamada et al., 1987). Estes radicais são subsequentemente reduzidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima antioxidante cobre-zinco superóxido-dismutase (CuZnSOD) presente no citosol. Tanto o $O_2^{\bullet-}$ quanto o H_2O_2 têm sido descritos como indutores da expressão da AOX nas leveduras e plantas (Wagner, 1995; Wagner e Moore, 1997). Assim, a expressão da proteína pode ser estimulada não apenas em resposta as EROs produzidas pelo próprio microorganismo, mas também pelos radicais de oxigênio gerados por estas células do sistema imune dos mamíferos. Concomitantemente à geração de EROs, os macrófagos ativados produzem também óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), um potente inibidor do complexo IV da cadeia respiratória dos mamíferos (Torres et al., 1998). Assim, é provável que a expressão da AOX também constitua uma estratégia de defesa contra o $NO^{\bullet}$ produzido pelas células do sistema imune do hospedeiro.

1.2.4- A proteína desacopladora (UCP)

Além da dissipação de energia promovida pelas NADH desidrogenases e AOX, que diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa, outro mecanismo dissipativo foi descrito recentemente nas mitocôndrias de *C. albicans* através da descoberta da proteína

desacopladora (UCP) nesta espécie (Cavalheiro et al., 2004). Esta proteína, descrita inicialmente em mitocôndrias de tecido adiposo marrom de mamíferos hibernantes (Nicholls, 1978), possibilita a reentrada de prótons na matriz mitocondrial interna através de um ciclo de ácidos graxos (Garlid et al., 1996). Neste ciclo, a UCP catalisa o transporte de ácidos graxos desprotonados da matriz para o citosol. O retorno destes ácidos graxos através do mecanismo de “flip-flop” (Skulachev, 1991; 1999, veja esquema 3) resulta num ciclo fútil de prótons, dissipando a energia protomotiva gerada pela oxidação de substratos na cadeia respiratória (Jezek et al., 1996). O ciclo de H^+ estimulado pela proteína desacopladora é sensível à inibição alostérica por nucleotídeos de purina como ATP e GTP, e é extremamente sensível a BSA, que remove ácidos graxos, essenciais ao ciclo de H^+ (Jezek et al., 1996; Sluse et al., 1998). A descoberta da proteína desacopladora nas mitocôndrias de *C. albicans* foi obtida a partir de estudos funcionais envolvendo os efeitos de ATP, GTP e BSA no acoplamento mitocondrial. Estes sistemas dissipadores de energias presentes em fungos, que alteram a eficiência da fosforilação oxidativa, podem exercer um papel relevante no balanço energético da célula. De fato, o suprimento de substratos redutores, a energia e a demanda de carbonos para a biossíntese estão acoplados à respiração (Jarmuszkiewicz et al., 2001). Condições metabólicas que induzem um aumento dos substratos e do potencial de fosfato (imprescindível para a síntese de ATP) levam a um desequilíbrio entre o suprimento e a demanda energética. Um aumento da atividade da AOX, que não é diretamente controlada pelo status energético da célula, diminuirá o poder redutor do microorganismo. Por outro lado, um aumento da atividade da UCP, que consome o $\Delta\mu H^+$, diminuirá o potencial de fosfato. Assim, a atividade das duas proteínas pode teoricamente corrigir este desbalanço. Deste modo, uma possível conexão entre a atividade da AOX e da UCP através de uma regulação comum e suas possíveis complementaridades pode ser extremamente importante para a eficiência da fosforilação oxidativa e para o status energético da célula. Esta conexão pode ser uma das razões para a coexistência de dois sistemas de dissipação energética nos fungos.



Esquema 3- Representação esquemática do mecanismo de ação da UCP segundo Vercesi et al. (2006) (modificado). Neste mecanismo a UCP funciona como um carreador de ânions de ácidos graxos da matriz para o citosol. Os ácidos graxos são então protonados, retornando a matriz através do mecanismo de “flip-flop”.

1.2.5- A cadeia respiratória paralela (PAR)

Em contraste às plantas, Guérin et al. (1989) observaram que a oxidação de substratos exógenos como o NADH e o NADPH pelas mitocôndrias de *C. parapsilosis* ocorria preferencialmente através de um via diferente da cadeia respiratória clássica (CRC) ou da AOX. Posteriormente, Guérin e Camougrand (1994) propuseram um modelo da cadeia respiratória das leveduras no qual esta segunda via alternativa seria paralela à cadeia dos citocromos, permitindo que os elétrons fossem desviados ao nível do complexo *bc1*, de maneira insensível à antimicina A, mas inibida por amital (Camougrand et al., 1988), SHAM, altas concentrações de mixotiazol (Camougrand et al., 1991) e cianeto (Guérin et al., 1989). A presença desta via pode ser uma reposição funcional da via fermentativa, ausente nestas leveduras, possibilitando a estes organismos o crescimento em ambientes não fermentativos e na presença de drogas que inibem o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória.

A partir destes estudos, um novo modelo de cadeia respiratória da *C. parapsilosis* foi proposto recentemente por nosso grupo de pesquisa (Milani et al., 2001). Através de medidas de consumo de oxigênio, observou-se que as mitocôndrias destas leveduras, cultivadas na ausência de inibidores da cadeia respiratória, possuem três oxidases terminais e quatro rotas para o fluxo de elétrons que levam à redução do oxigênio. Por meio da determinação das razões ADP/O destas mitocôndrias, os autores verificaram que a via clássica dos citocromos e a AOX compartilham elétrons ao nível da ubiquinona, sendo que a capacidade da via dos citocromos é duas vezes maior do que a da AOX. Outra constatação experimental obtida refere-se à interligação entre as cadeias CRC e PAR, que ocorre também entre o citocromo *c* da CRC e a oxidase terminal da PAR, tornando o transporte de elétrons ainda mais ramificado e flexível. Os autores demonstraram ainda que a capacidade da via paralela corresponde a aproximadamente um décimo da respiração total.

1.3- A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas naturalmente nas células aeróbicas como subprodutos de reações metabólicas e, sobretudo, pela respiração mitocondrial. Estima-se que 0,01 a 1% do oxigênio consumido pela organela seja reduzido a radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em estágios intermediários da cadeia respiratória (Liu, 1997; Turrens, 1997). Dentre os complexos respiratórios, as principais fontes de formação dos $O_2^{\bullet-}$ são a NADH desidrogenase (complexo I) e a coenzima Q (ver esquema 4) (Boveris e Chance, 1973; Turrens et al., 1985).

A geração de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo I é promovida por substratos dependentes de NAD tais como o malato, glutamato e piruvato. A produção de EROs neste complexo pode ser estimulada também por inibidores da NADH desidrogenase, como a rotenona, quando na presença de substratos que geram NADH (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997). Na ausência destes equivalentes redutores, a formação de $O_2^{\bullet-}$ neste ponto da cadeia respiratória pode ser estimulada ainda pelo succinato. A oxidação deste substrato pela succinato desidrogenase resulta num fluxo reverso de elétrons do complexo II para os

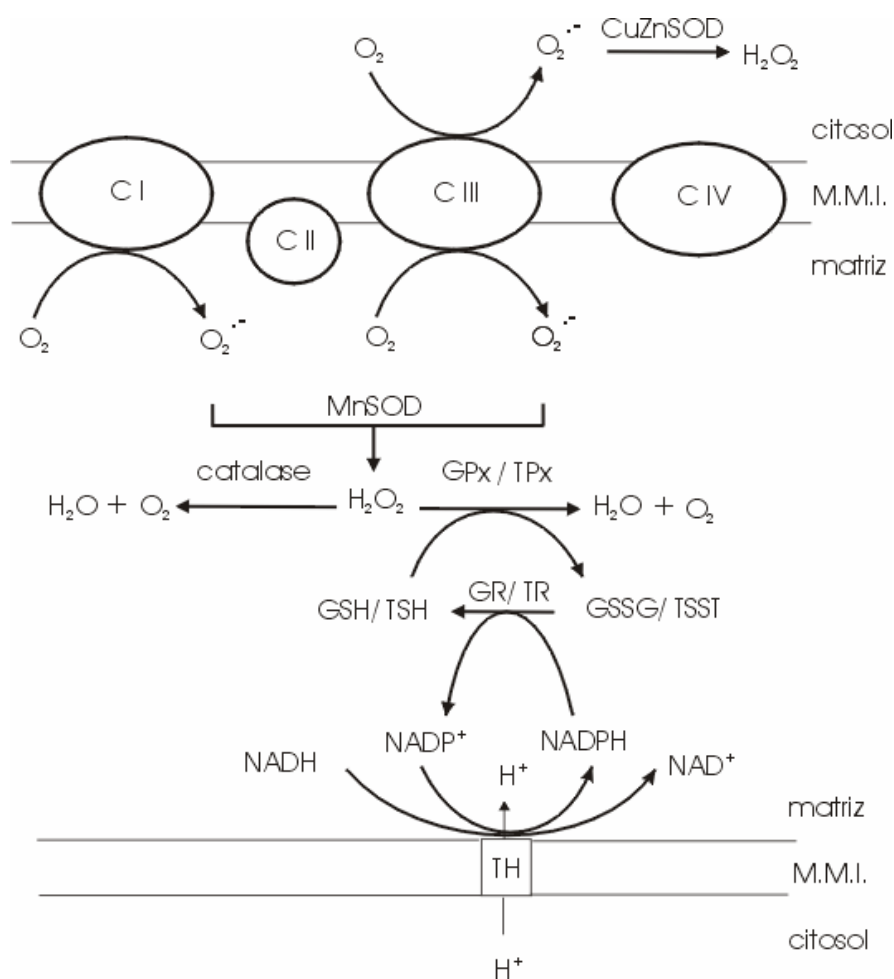
componentes do complexo I (Gyulkhandanyan e Pennefather, 2004; Liu et al., 2002). Neste caso, a geração de EROs pela NADH desidrogenase é prevenida pela rotenona.

Em condições fisiológicas, os elétrons são transferidos da NADH desidrogenase para a coenzima Q (UQ), promovendo sua redução (UQH₂). A UQH₂ transfere então os elétrons para a citocromo *c* oxidase, convertendo-se no ânion semiquinona (UQ^{•-}), que é um radical livre capaz de gerar radicais superóxido (Kowaltowski e Vercesi, 1999). O vazamento de elétrons neste ponto da cadeia respiratória é estimulado pelo cianeto e antimicina A (Boveris et al, 1976; Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1985; Turrens, 1997;). Por outro lado, protonóforos e sistemas dissipadores de energia, como a AOX e a UCP, diminuem a produção destes compostos através do aumento da velocidade respiratória. Este aumento provoca uma diminuição do tempo de vida da UQ^{•-} e redução da tensão de oxigênio, resultando na diminuição da probabilidade de doação de elétrons da UQ^{•-} para o O₂ (Turrens, 1997).

1.4- Defesas antioxidantes mitocondriais

Ao longo do processo evolutivo, a mitocôndria desenvolveu um grande número de enzimas antioxidantes, responsáveis pela remoção das EROs, mantendo assim a integridade da organela. O radical superóxido (O₂^{•-}), gerado naturalmente em pequenas quantidades pela cadeia respiratória, é reduzido a H₂O₂ pelas superóxido dismutases (Esquema 4), como a manganês superóxido-dismutase (MnSOD). O H₂O₂ é então convertido à H₂O pelas enzimas antioxidantes catalase (em mitocôndrias de coração), pela glutathiona peroxidase (GPx) e pela tioredoxina peroxidase (TPx). Estas duas últimas funcionam às custas da oxidação da glutathiona (Inoue et al., 1999) e da tioredoxina, respectivamente. Nos fungos, a glutathiona está presente em altas concentrações e desempenha uma função importante em resposta a diversos tipos de estresse (Pocsi et al., 2004). A forma reduzida da glutathiona (GSH) é o doador de elétrons para a GPx e a sua forma oxidada (GSSG) é reduzida à GSH pela glutathiona redutase (GRx), utilizando o NADPH como doador de elétrons (Izawa et al., 1995). O NADP⁺ formado é então reduzido pelo NADH, numa reação catalisada pela enzima

NADP transhidrogenase (TH). A transferência de elétrons do NADH para o NADP^+ é acoplada ao bombeamento de H^+ pela proteína, que ocorre do citosol para a matriz mitocondrial (Hoek e Rydstrom, 1988). Deste modo, a atividade da enzima proporciona um efeito antioxidante indireto, uma vez que a diminuição do $\Delta\mu\text{H}^+$ é acompanhada pelo aumento da respiração mitocondrial. Como discutido acima, este aumento do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória previne a geração de EROs mitocondrial.



Esquema 4- Representação esquemática da geração e remoção de EROs mitocondriais. Os principais sítios de geração dos $O_2^{\bullet-}$ são os complexos I e III (C I e C III, como indicado na figura). Estes radicais são reduzidos a H_2O_2 pelas enzimas ZnCuSOD (no citosol) e pela MnSOD (na matriz). Na matriz o H_2O_2 é convertido à H_2O pelas enzimas catalase (em mitocôndrias de coração), glutatona peroxidase e tiorredoxina peroxidase. A redução do H_2O_2 pela glutatona peroxidase e pela tiorredoxina peroxidase ocorre às custas da oxidação da glutatona e tiorredoxina, respectivamente. Estas enzimas são reduzidas pela glutatona redutase e pela tiorredoxina redutase utilizando o NADPH como doador de elétrons. O $NADP^+$ é então reduzido a NADPH pela NADP transhidrogenase (TH), às custas da oxidação do NADH e do gradiente de prótons transmembranar.

1.5- Estresse Térmico

Uma grande variedade de microorganismos eucarióticos e procarióticos sofre uma rápida perda de viabilidade quando exposta a temperaturas não compatíveis com a ideal (Argüeles, 1997). Entretanto, estas células possuem alguns mecanismos que possibilitam à sobrevivência sob condições de estresse térmico. Quando submetidas a um choque de temperatura, as leveduras sofrem alterações expressivas na sua atividade genética (Piper, 1993). Estas alterações incluem o re-direcionamento da transcrição gênica, levando à síntese de mRNAs que codificam proteínas chamadas “heat-shock proteins” (hsp). Estas proteínas desempenham um papel importante para a fisiologia celular, auxiliando no dobramento de outras proteínas e no estabelecimento da conformação apropriada e prevenção da agregação destes compostos sob condições de estresse térmico (Rikhvanov et al., 2002).

Ao nível bioenergético, há poucas informações disponíveis sobre a fisiologia respiratória de leveduras expostas ao choque térmico. Estudos recentes com o fungo *Cryptococcus neoformans* (Akhter et al., 2003; Steen et al., 2002) mostraram que a transferência das células de 25°C para 37°C induziu a expressão do gene da AOX, sugerindo que a proteína está envolvida na resposta ao estresse térmico. Anteriormente, Habel et al. (1991), verificaram que a capacidade respiratória do fungo *N. crassa* foi reduzida significativamente quando as células foram submetidas a um aumento de 15°C, e que esta respiração foi insensível ao KCN, indicando também um aumento da expressão da AOX.

2- OBJETIVOS

- 2.1- Caracterizar os diferentes componentes da cadeia respiratória de *C. albicans*.
- 2.2- Verificar a contribuição das vias de redução do oxigênio, bem como o estado redox de seus componentes, para o crescimento do microorganismo.
- 2.3- Observar as atividades das diferentes vias de redução do oxigênio sobre condições de estresse térmico, evidenciando as vias essenciais para resistência ao choque térmico.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Origem e preparo do material biológico e reagentes

A cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) 90028 de *C. albicans* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Angélica Z. Schreiber do Departamento de Patologia Clínica (Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP).

A maioria dos reagentes utilizados foi adquirida junto à Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Todos eram de grau de pureza analítica ou maior.

Os inibidores da respiração mitocondrial antimicina A, BHAM e rotenona foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos à temperatura ambiente, protegidos da luz. O KCN foi dissolvido em H₂O destilada e o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7.2 utilizando-se NaOH.

3.2- Manutenção das células de *C. albicans*

As cepas de *C. albicans* foram mantidas em ASD - Ágar Sabouraud Dextrose (10 mg/mL de peptona, 40 mg/mL de glicose e 15 mg/mL de ágar) e repicadas com 48 h de antecedência ao início de cada experimento. Vários repiques foram mantidos em água destilada estéril e reativados sempre que a cepa apresentou alteração de suas características macroscópicas, microscópicas e/ou bioquímicas.

3.3- Preparação do pré-inóculo

Foram realizados dois repiques do microrganismo em ASD, a fim de garantir a pureza e a viabilidade das amostras. Uma alçada do segundo repique foi emulsionada em 50 mL de meio de cultura YEPG (extrato de levedura 1%, glicerol 2% e bactopectona 2%), incubando-se durante 24 h a 37°C.

3.4- Preparação do inóculo

Após 24 h de incubação do pré-inóculo, foram transferidos aproximadamente 10 mL para um erlenmeyer contendo 600 mL de meio YEPG. O inóculo foi então incubado por 24 h, sob agitação a 200 rpm, a 37°C.

3.5- Preparo de esferoplastos de *C. albicans*

Os esferoplastos (leveduras depletadas de sua parede celular) foram preparados como descrito por Milani et al., 2001. As leveduras foram coletadas a partir de 1 L do meio de cultura por centrifugação e lavadas em água fria e tampão tris - HCl 50 mM, pH 7,8, contendo 1 mM de sorbitol e 10 mM de MgCl₂. As células foram ressuspensas no mesmo tampão contendo 30 mM de ditioneitol. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente com agitação, as células foram coletadas por centrifugação diferencial e ressuspensas no tampão inicial contendo litcase (1 mg/mL de células) e ditioneitol 1 mM e incubadas a 30°C até 90% serem convertidas em esferoplastos. Para confirmar a conversão a esferoplastos, uma pequena amostra foi retirada, adicionada à água e monitorada espectrofotometricamente a 530 nm, uma vez que a permeabilização da parede celular é acompanhada pelo inchamento das células e conseqüente diminuição da densidade óptica da suspensão. A digestão foi interrompida por resfriamento da suspensão em banho gelado. Os esferoplastos obtidos foram então lavados duas vezes no mesmo tampão.

3.6- Isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias das leveduras foram isoladas como descrito por Jarmuszkiewicz et al., 2000. Após a obtenção dos esferoplastos, o pellet foi ressuspenso em tampão de tris-HCl 10 mM, pH 7,4, contendo 0,6 mM de sorbitol, 1 mM de EDTA, 0,5% de BSA e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Os esferoplastos foram rompidos mecanicamente com o auxílio de um homogenizador Dounce. As células danificadas foram separadas do sobrenadante através de uma centrifugação de 10 min a 1089 g. As mitocôndrias foram então coletadas do sobrenadante por centrifugação (10 minutos a 3415 g) e lavadas em meio contendo 0,6 mM de manitol, 1 mM EDTA, 1% BSA e 10 mM de tris-HCl, pH 7,0.

3.7- Dosagem de proteínas

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (Gournall et al., 1949), modificado pela adição de 1% de colato (Kaplan e Pedersen, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da

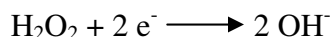
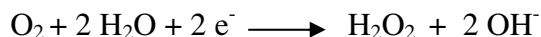
concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.8- Obtenção das curvas de crescimento

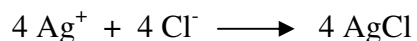
As leveduras foram incubadas por aproximadamente 16 h a 37°C sob agitação (200 rpm) no meio de crescimento YEPG, na presença e ausência de inibidores da cadeia respiratória. Alíquotas da cultura foram retiradas a cada hora, medindo-se a densidade óptica da suspensão a 530 nm num espectrofotômetro U-3000 Hitachi.

3.9- Medida do consumo de O₂

A respiração das suspensões celulares e mitocondriais foi determinada polarograficamente através de um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a um oxígrafo Gilson, em câmara de vidro fechada e termostatizada, com agitação magnética. O eletrodo tipo Clark compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma membrana de teflon ou polietileno, permeável ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como aceptor de elétrons, segundo as reações:



Na superfície do ânodo a prata é oxidada, gerando cloreto de prata, segundo as reações:



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O₂ na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo tipo Gilson, onde foi realizada a leitura.

3.10- Quantificação da liberação de EROs mitocondrial

A produção de EROs pela organela foi monitorada fluorimetricamente a 28°C utilizando-se 10 µM da sonda 2,7- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH). Este composto, que não é fluorescente, difunde-se passivamente através das membranas biológicas. Na matriz mitocondrial, a sonda sofre clivagem dos grupos acetato pelas esterases intramitocondriais, produzindo a diclorodihidrofluoreceína (DCF), um composto fluorescente, que é retido no interior da organela. A liberação das EROs foi então medida através da oxidação do DCF nos comprimentos de onda de emissão e de excitação de 525 nm e 450 nm, respectivamente. É importante ressaltar que este composto não é específico para o H₂O₂, podendo sofrer a oxidação de outras EROs.

A produção de H₂O₂ mitocondrial foi determinada também através da oxidação de 30 µM de Amplex Red na presença de 1 U/mL peroxidase de raiz forte (“horseradish peroxidase” - HRP). A fluorescência da sonda foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 nm e 587 nm, respectivamente. Na presença da peroxidase de raiz forte, o Amplex Red reage com o H₂O₂ na estequiometria de 1:1, sendo oxidado a resorufina e ocorrendo assim um aumento da fluorescência da sonda.

3.11- Quantificação dos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona oxidada foram calculados como descrito por Demasi et al. (2003). A glutathiona intracelular foi extraída através da lise das células em 1 volume de *glass beads* e 2 volumes de ácido sulfosalicílico 3.5%. A suspensão foi então agitada em aparelho tipo Vortex por 20 minutos a 4°C e centrifugada 18000 g por 5 minutos. Este procedimento foi repetido 2 vezes.

O princípio deste método baseia-se na reação entre a GSH e o 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) na presença da glutathiona redutase e do NADPH. O DTNB reage espontaneamente com a GSH, formando o ânion colorido TNB e o conjugado incolor GS-TNB. A glutathiona redutase cliva este conjugado, utilizando o NADPH como co-fator, resultando em GSH e TNB, desenvolvendo mais cor. A GSH reage novamente com o DTNB, reiniciando o ciclo. A quantidade de GSH foi avaliada através da absorbância do produto gerado. No caso da quantificação da GSSG, inicialmente fez-se um pré-tratamento a N-etilmaleimida (NEM). Este composto reage com os grupamentos tiólicos reduzidos do tripeptídeo, indisponibilizando-os para a reação com o DTNB. Assim, a fração oxidada presente na amostra é inicialmente convertida à GSH pela ação da enzima glutathiona redutase e, em seguida entra no ciclo.

3.12- Análises estatísticas

Os traçados mostrados são representativos de pelo menos 3 experimentos similares conduzidos usando preparações diferentes. As médias e os erros padrões das médias foram determinados utilizando-se o software OriginPro 7.5. As diferenças entre os grupos analisados foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$, utilizando-se o teste one-way ANOVA.

4- RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES

4.1- A cadeia transportadora de elétrons de *C. albicans*

A fim de caracterizar os diferentes componentes da cadeia respiratória da *C. albicans* e suas participações no crescimento celular, nós inicialmente verificamos o transporte de elétrons na presença de inibidores das vias de redução do oxigênio já descritas em *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001).

A CRC tem sido descrita como a via principal via utilizada pelas espécies de *Candida* no transporte de elétrons (Milani et al. 2001; Helmerhorst et al., 2002). De fato, observa-se na Figura 1 que a velocidade respiratória da suspensão de mitocôndrias isoladas de células saudáveis, sustentada por substratos que geram NADH, é inibida significativamente após a adição de 4 μ M de antimicina A (AA), um bloqueador do Complexo III da CRC. O fluxo de elétrons resistente à antimicina A é então desviado para PAR ao nível da coenzima Q (Esquema 1). A adição de 10 mM de KCN bloqueia as citocromo *c* oxidases de CRC e PAR, restando apenas a AOX como via para a redução do oxigênio. Finalmente, o fluxo de elétrons remanescente é interrompido pela adição de 2mM de BHAM, um inibidor da AOX. Este resultado indica que o oxigênio nas mitocôndrias de *C. albicans* pode ser reduzido por três oxidases terminais: as citocromo *c* oxidases da CRC e PAR e pela AOX, assim como observado em *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001). Além disso, estes dados estão de acordo com o modelo segundo o qual estes complexos respiratórios coexistem nas leveduras e o fluxo de elétrons pode ser compartilhado entre eles, dependendo do inibidor respiratório utilizado (Helmerhorst et al., 2005).

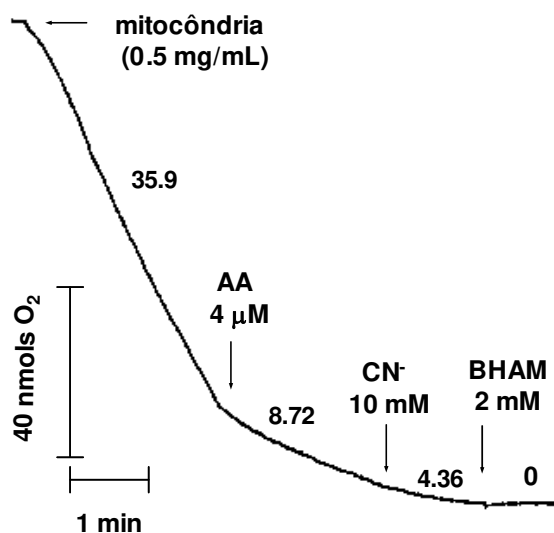


Figura 1- Efeito de diferentes inibidores da cadeia respiratória nas mitocôndrias de *C. albicans*. A respiração da suspensão mitocondrial (0,5mg/mL) foi medida em tampão de Hepes 10mM (pH = 7,2), contendo 125mM de sacarose, 65mM de KCl, 1mM de MgCl₂ e 2,5mM de K₂HPO₄ na presença de BSA 1%. A respiração foi sustentada por malato (5mM), piruvato (5mM) e α -cetoglutarato (5mM). As adições de antimicina A (AA), cianeto (CN⁻) e BHAM foram feitas como indicado pelas setas. Os números representam o consumo de O₂ em nmoles. min⁻¹ . mg proteína⁻¹. Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes.

4.2- Determinação da importância das diferentes vias de redução de oxigênio para a vitalidade da *C. albicans*

Após a confirmação da presença de três vias para a redução do O₂ nas mitocôndrias de *C. albicans*, nós investigamos as suas contribuições no crescimento do organismo. Assim, as leveduras foram crescidas na ausência e presença dos inibidores mencionados acima.

Na Figura 2 observa-se que os inibidores das vias respiratórias KCN e antimicina A preveniram significativamente o crescimento celular quando comparadas às leveduras cultivadas na ausência das drogas. A presença de 2 μ M de rotenona, um bloqueador do Complexo I da CRC, não inibiu completamente o crescimento celular.

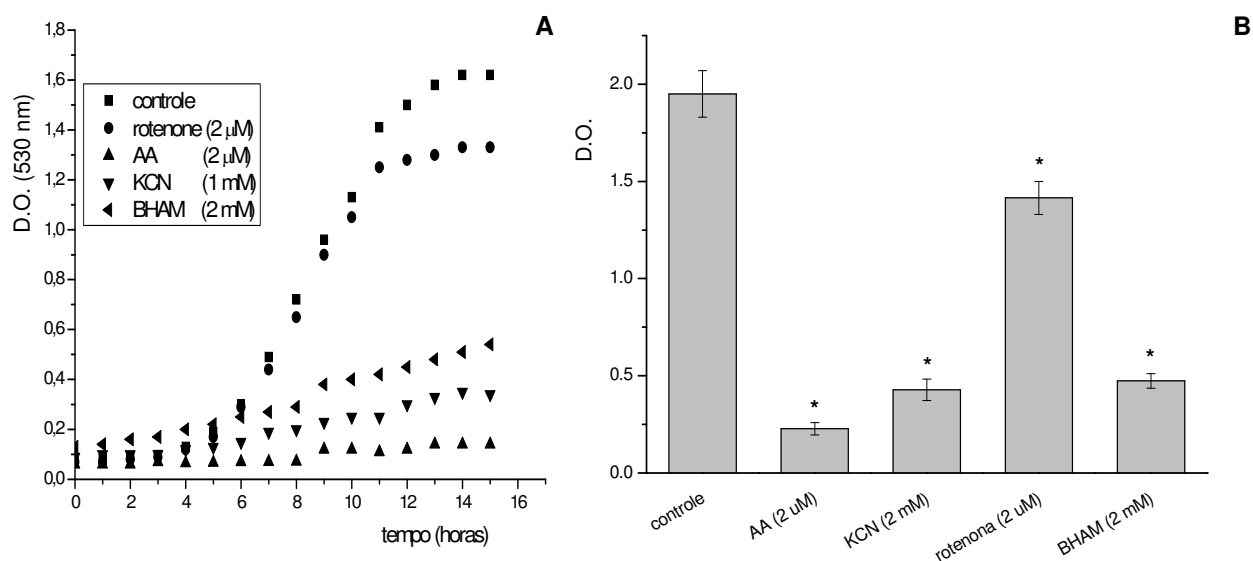


Figura 2- Curvas de crescimento de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas na ausência (traço controle) e na presença dos inibidores cadeia respiratória, conforme indicado na figura (Painel A). Este experimento é representativo de uma série de 4 repetições semelhantes. O painel B refere-se à média ($\pm$ SEM) dos valores de densidade óptica das suspensões celulares após 16h de cultivo. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Este resultado indica que a inibição do Complexo I não é suficiente para inibir o crescimento da levedura. Além do Complexo I, a *C. albicans* também expressa NADH desidrogenases (interna e externa) que transferem elétrons do NADH para a ubiquinona (Joseph-Horne et al., 2001), mas não contribuem para o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), fundamental para a síntese de ATP. Helmerhorst et al. (2002) relataram que a

respiração mitocondrial sustentada por NADH exógeno não apresenta sensibilidade à rotenona, demonstrando que a NADH desidrogenase externa não é sensível à droga. Neste trabalho, os autores também observaram que a razão ADP/O foi aproximadamente 30% maior quando se utilizou malato/piruvato, que gera NADH na matriz mitocondrial, do que para o NADH adicionado. Embora não seja possível estabelecer uma relação direta entre a síntese de ATP na presença de diferentes substratos e o crescimento da levedura (que ocorre em condições fisiológicas em que há disponibilidade de vários equivalentes redutores), nós observamos uma redução de aproximadamente 20% do crescimento na presença de rotenona quando comparada à cultura controle. Deste modo, esta diminuição da razão ADP/O, observada *in vitro*, parece refletir no crescimento da levedura. Assim, a inibição do Complexo I promove um efeito apenas moderado no crescimento, uma vez que os Complexos III e IV ainda podem sustentar o bombeamento de prótons através da oxidação de substratos citoplasmáticos, como NADH, NADPH e glicerol 3-fosfato. A respiração pode ser sustentada ainda pela oxidação do succinato pela succinato desidrogenase (Complexo II). A presença de 2 mM de BHAM também inibiu expressivamente o crescimento do organismo, evidenciando a importância da AOX na proliferação celular.

O próximo passo do trabalho foi verificar o efeito dos inibidores sobre a respiração mitocondrial. Como observado na Figura 3, a velocidade respiratória é inibida em aproximadamente 40% em relação à respiração controle (ausência de drogas) na presença de 2 μ M de rotenona. Adições de 1 mM de KCN e 2 μ M de antimicina reduziram expressivamente o consumo de oxigênio, por volta de 80 e 85%, respectivamente. Na presença de BHAM houve uma diminuição de aproximadamente 30%, assim como observado nas mitocôndrias de *C. parapsilosis* (Milani et al., 2001).

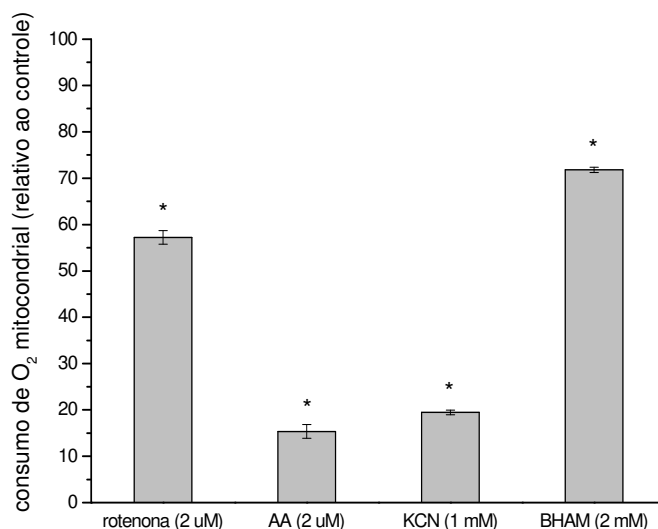


Figura 3- Efeito de diferentes inibidores da cadeia respiratória nas mitocôndrias de *C. albicans*. A respiração da suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL) foi medida nas mesmas condições da figura 1. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

É importante ressaltar que embora o efeito do BHAM tenha sido relativamente pequeno na respiração mitocondrial, o composto inibiu expressivamente a proliferação celular. Por outro lado, a rotenona proporcionou uma inibição maior da respiração mitocondrial, mas seu efeito sobre o crescimento do microorganismo foi significativamente menor. Estes resultados sugerem que o crescimento da levedura é afetado pela inibição de pontos específicos da cadeia respiratória e não pela quantidade de inibição da respiração. Deste modo, nós investigamos o efeito de baixas doses dos outros inibidores, que proporcionam inibições similares ao BHAM, sobre o crescimento da levedura.

Uma vez que a inibição proporcionada pelo BHAM foi de aproximadamente 30% da respiração total, nós realizamos primeiramente uma titulação de rotenona, antimicina e KCN com o intuito de se obter uma inibição de aproximadamente 30% da respiração nas organelas isoladas. Na Figura 4 observa-se que as concentrações de rotenona, antimicina e KCN que promovem inibições semelhantes ao do BHAM são de: 500 nM; 800 nM e 15 nM, respectivamente.

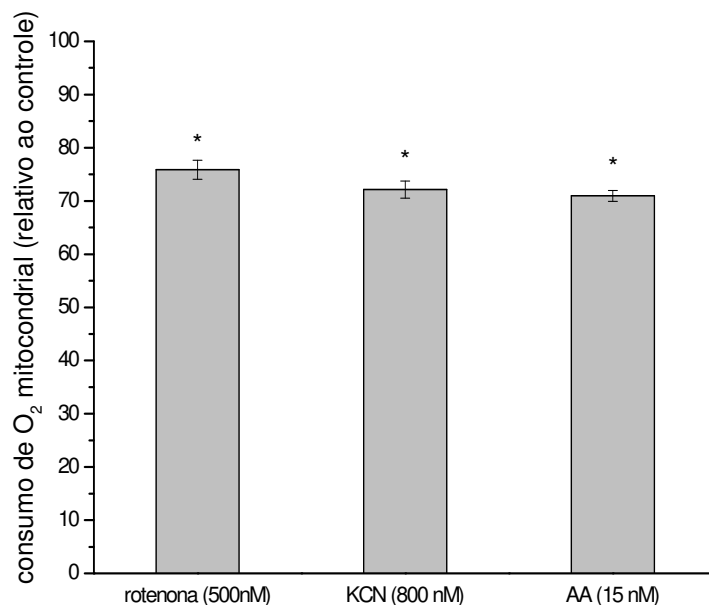


Figura 4- Efeito de diferentes inibidores da cadeia respiratória nas mitocôndrias de *C. albicans*. A respiração da suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL) foi medida nas mesmas condições da figura 1. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

A partir dos valores obtidos na Figura 4, as leveduras foram cultivadas na ausência e presença destas concentrações das drogas. Como observado na Figura 5, não houve crescimento celular apenas na presença da antimicina, evidenciando a importância da funcionalidade do Complexo III para a vitalidade celular. Com a inibição do Complexo III, o bombeamento de H^+ é mantido somente pelo Complexo I, afetando assim a síntese de ATP. Por outro lado, as inibições do Complexo I e IV promovidas pela rotenona e pelo cianeto não foram suficientes para inibir o crescimento da levedura.

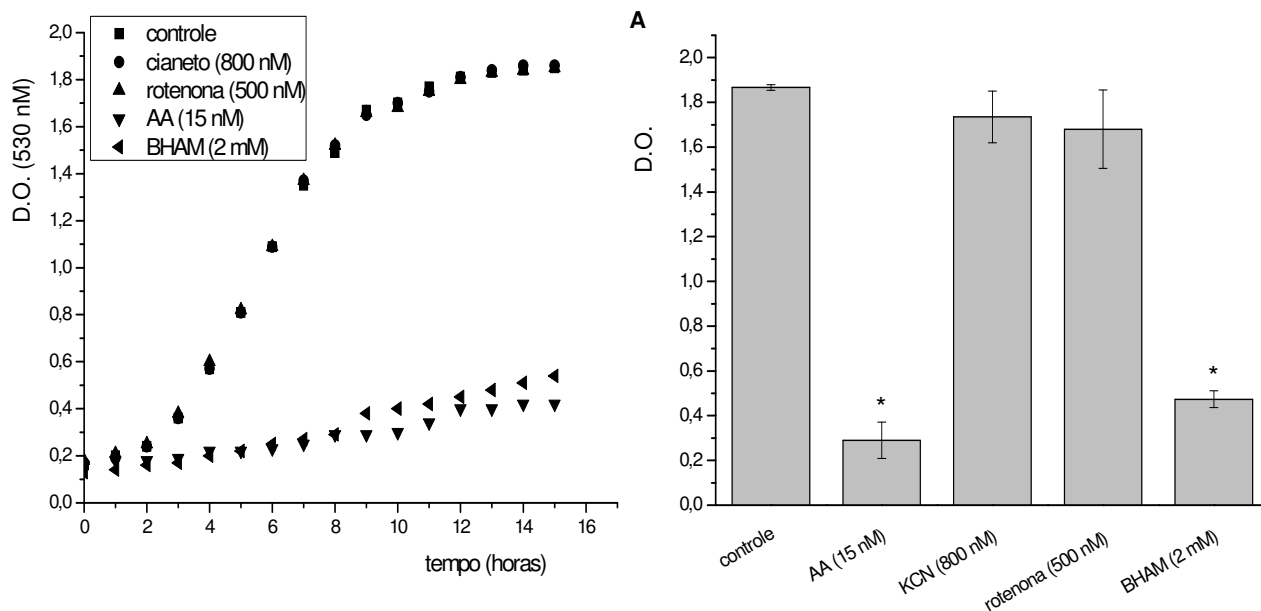


Figura 5- Curvas de crescimento de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas na ausência (traço controle) e na presença dos inibidores cadeia respiratória, conforme indicado na figura (Painel A). Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes. O painel B refere-se às médias ($\pm$ SEM) dos valores de densidade óptica das suspensões celulares após 16h de cultivo. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

O próximo passo foi verificar o efeito destas concentrações das drogas sobre o consumo de O_2 das células intactas, para confirmar que realmente havia apenas inibição parcial do consumo de oxigênio sob estas condições experimentais. Na Figura 6 observa-se que a velocidade respiratória da suspensão de células, mantida por substratos endógenos, é inibida em 10% na presença de 500 nM de rotenona, enquanto que a presença de 800 nM de KCN provocou uma diminuição de aproximadamente 20% da respiração. O efeito causado por 15 nM de antimicina foi bastante significativo, proporcionando uma inibição de aproximadamente 75% da respiração controle. A concentração de antimicina que proporcionou uma inibição de similar a do BHAM (aproximadamente 30%) foi de 7.5 nM.

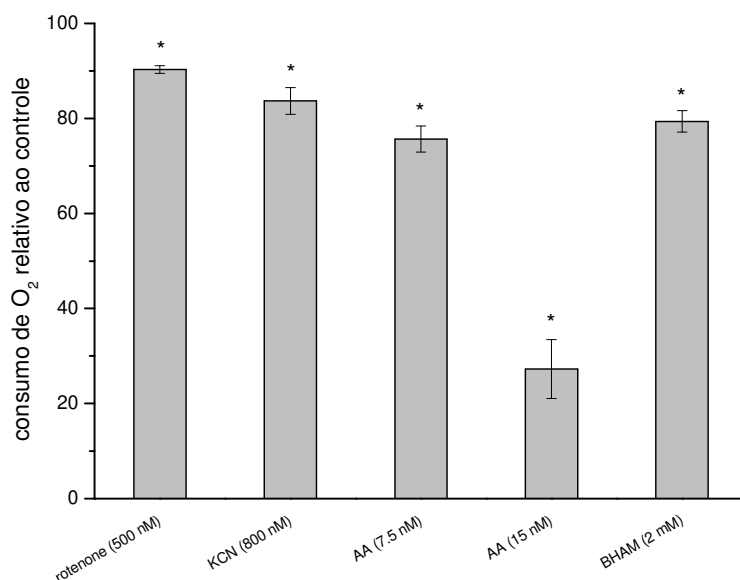


Figura 6- Efeito dos inibidores da cadeia respiratória nas células de *C. albicans*.

A respiração da suspensão celular (0,5 mg/mL) foi medida nas mesmas condições da Figura 1. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

A partir destes resultados ainda não é possível determinar a importância da funcionalidade do Complexo III da CRC para a proliferação celular, uma vez que a concentração de 15 nM de antimicina inibiu consideravelmente a respiração das suspensões celulares. Deste modo, as células foram cultivadas na presença de 7.5 nM de antimicina. Na figura 7 observa-se que esta concentração da droga também promoveu a inibição considerável da proliferação celular. Este resultado confirma a importância do Complexo III da CRC para o crescimento da levedura uma vez que a inibição de 30% da respiração celular promovida pela antimicina ocasionou a perda total da viabilidade celular. Este experimento confirma ainda a nossa hipótese inicial de que inibições respiratórias iguais em diferentes pontos da cadeia transportadora de elétrons da *C. albicans* proporcionam efeitos distintos sobre o crescimento da levedura.

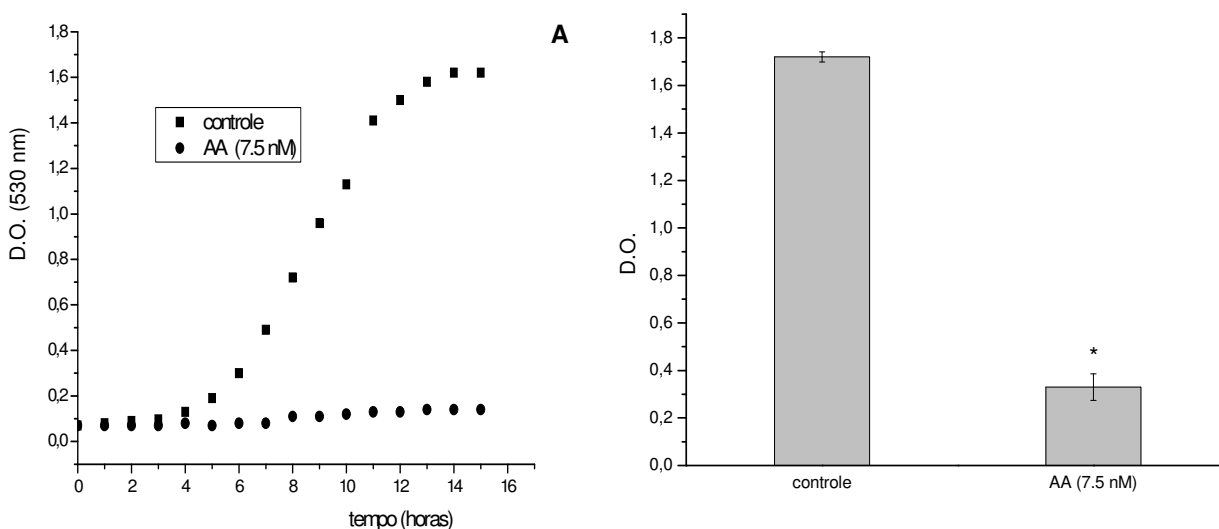


Figura 7- Curvas de crescimento de *C. albicans*. As leveduras foram cultivadas na ausência (traço controle) e na presença de 7.5 nM de antimicina, conforme indicado na figura (Painel A). Este experimento é representativo de uma série de 3 repetições semelhantes. O painel B refere-se às médias ($\pm$ SEM) dos valores de densidade óptica das suspensões celulares após 16h de cultivo. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Um ponto interessante a ser ressaltado é que as inibições obtidas acima foram parciais, diminuindo assim a possibilidade que a redução da fosforilação oxidativa tenha sido responsável pela diminuição da proliferação celular. Outro ponto que reforça esta hipótese é o efeito do BHAM sobre o crescimento, que permitiria uma eficiência ainda maior da produção de ATP (Milani et al., 2001). Deste modo nós inferimos que a diminuição do crescimento celular devia-se ao estresse oxidativo, uma vez que o complexo III da CRC e a AOX são aceptores dos elétrons provenientes da CoQ, importante fonte de EROs mitocondrial. Assim, nós investigamos se a perda de viabilidade nestas condições experimentais estava relacionadas às alterações no estado redox da cadeia respiratória e a geração de EROs.

4.3- Efeito da inibição das vias de redução de O₂ sobre a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Nós observamos que as mitocôndrias de *C. albicans* apresentaram um aumento significativo da produção de EROs, medido através do aumento da fluorescência do DCF (Rothe e Valet, 1990), quando tratadas com antimicina (Figura 8). Por outro lado, a rotenona e o KCN não aumentaram de maneira significativa a oxidação do DCF. Este resultado indica que a geração de radicais superóxido, catalisada pela inibição do Complexo I, não é tão significativa como observado em outros tecidos (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Turrens 2003), provavelmente devido à competição entre as diferentes NADH desidrogenases. As pequenas doses de KCN utilizadas em nossos experimentos provavelmente favoreceram a inibição da CRC, mas não da PAR, que apresenta uma sensibilidade menor ao composto (Milani et al., 2001). Como resultado, os elétrons são desviados ao nível do citocromo *c* para a citocromo *c* oxidase da PAR, prevenindo a formação de EROs. Diferentemente do KCN, a antimicina age diretamente no Complexo III, proporcionando uma redução maior da coenzima Q, maior fonte de radicais superóxido em vários tecidos (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Infelizmente, não foi possível medir a liberação de EROs nas células incubadas com BHAM, devido a uma reação entre o composto e a sonda utilizada (resultado não mostrado). Deste modo, nós utilizamos ainda a sonda amplex red na presença de peroxidase de raiz forte (“horseradich peroxidase” – HRP) para monitorar a geração de EROs mitocondrial na presença do BHAM. Porém, novamente ocorreu uma reação entre o composto e a sonda (resultado não mostrado). Mas, como discutido abaixo, nós utilizamos um segundo parâmetro para avaliar o estado redox das células na presença dos inibidores respiratórios.

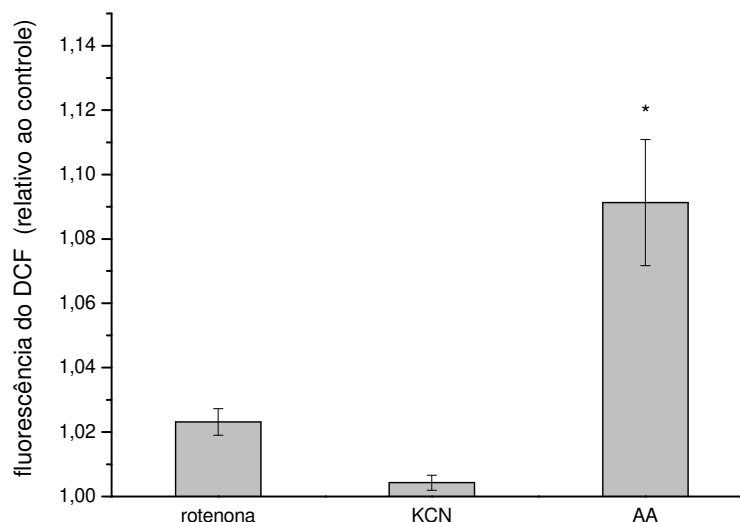


Figura 8- Liberação mitocondrial de EROs. A suspensão mitocondrial (0.5 mg/mL) foi incubada nas mesmas condições da Fig. 1 na presença de $10 \mu\text{M}$ de H_2DCF e os inibidores indicados. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

4.4- Determinação dos níveis de glutathione nas células tratadas com os inibidores do transporte de elétrons

Nós medimos a razão entre os níveis de glutathione oxidada e reduzida (GSSG/GSH) nas células incubadas na presença dos inibidores respiratórios. Estas medidas permitem uma avaliação do estado redox das células como resultado das alterações dos níveis de EROs. Como observado na Figura 9, as células tratadas com antimicina e BHAM apresentaram um aumento significativo dos níveis de glutathione oxidada, confirmando que há desbalanço redox nas células em condições em que há inibição de crescimento. Embora a rotenona e o KCN também tenham aumentado os níveis de GSSG/GSH relativos à cultura controle, este incremento não foi estatisticamente significativo. Este resultado indica que os tratamentos com o BHAM e a antimicina aumentaram o estado de redução da CoQ, resultando assim num maior vazamento de elétrons neste ponto da cadeia respiratória da levedura, aumentando a probabilidade de doação de elétrons da UQ^- para o O_2 (Turrens, 1997).

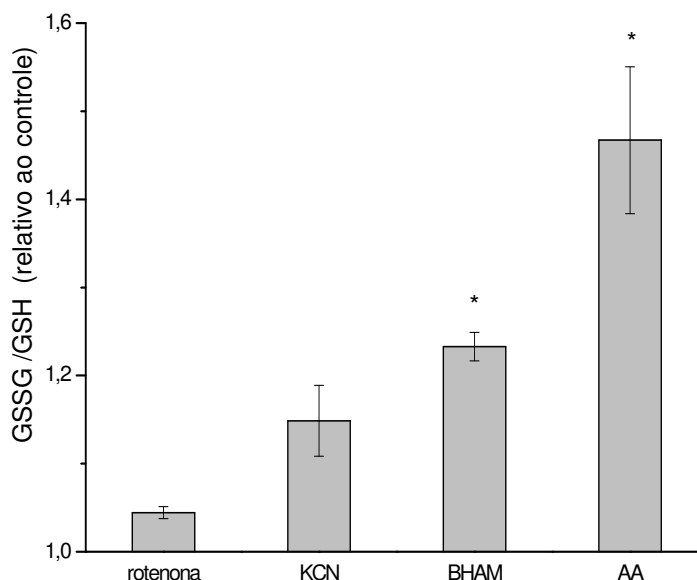


Figura 9- Níveis de GSSG/GSH em *C. albicans*. Os níveis celulares de GSSG/ GSH foram medidos na presença dos inibidores indicados, sobre as mesmas condições experimentais da Fig. 8. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam os grupos que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

4.5- Estudo da cadeia respiratória de *C. albicans* sobre condições de estresse térmico

A fim de verificar o efeito do estresse térmico sobre a expressão dos diferentes complexos respiratórios nas mitocôndrias de *C. albicans*, as leveduras foram submetidas a um aumento de temperatura de 17°C (de 25 para 42°C) por uma hora. Após este período de incubação, através de medidas de consumo de oxigênio, utilizando os inibidores da cadeia respiratória, observou-se às alterações das capacidades respiratórias das vias de transporte de elétrons.

Na Figura 10 observa-se que a adição de antimicina (2 μ M) às células incubadas a 25°C reduz o consumo de O₂ mitocondrial em aproximadamente 85% em relação ao grupo controle (ausência de inibidores). Por outro lado, nas células submetidas ao estresse térmico esta inibição foi por volta de 35%. Na presença da antimicina,

que bloqueia completamente a CRC, as únicas vias disponíveis para o transporte de elétrons são a AOX e a PAR (ver esquema 1). Na presença do KCN (10 mM), que inibe as citocromo *c* oxidases da CRC e da PAR, restando a AOX como única rota para o fluxo de elétrons, o perfil inibitório também foi significativamente alterado entre os dois grupos. Enquanto o composto proporcionou uma inibição de aproximadamente 90% da respiração nas células incubadas a 25°C, no grupo submetido ao choque térmico esta inibição foi de 65%. Curiosamente, a inibição da respiração mitocondrial promovida pelo BHAM não foi alterada significativamente nas duas condições experimentais. É importante ressaltar que na presença do BHAM o transporte de elétrons ocorre através da CRC e da PAR, uma vez que a AOX está completamente inibida. Embora estes resultados sugiram que o estresse térmico tenha alterado a capacidade das vias respiratórias, não é possível determinar ainda quais rotas alteradas. Deste modo, através da adição simultânea dos inibidores, nós investigamos os perfis inibitórios sob condições em que apenas uma via estivesse disponível para o transporte de elétrons.

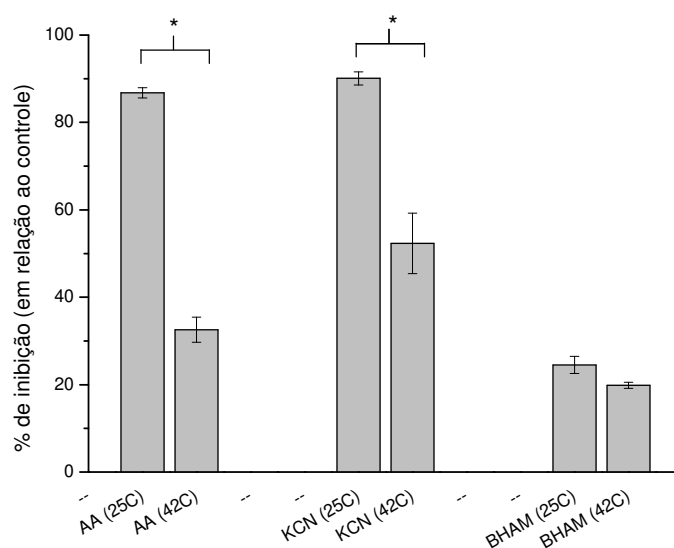


Figura 10- Efeito dos inibidores da cadeia respiratória nas células de *C. albicans*.

A respiração foi medida nas mesmas condições da figura 1 nas células incubadas a 25°C e 42°C. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam as diferenças significativas em relação aos grupos comparados ($p < 0.05$).

Na Figura 11, observa-se que as células incubadas a 25°C apresentaram uma diminuição de aproximadamente 85% da respiração, em relação ao grupo controle, após a adição concomitante de antimicina (2 μ M) e BHAM (2 mM), que inibem totalmente a CRC e a AOX, respectivamente. Por outro lado, nas células submetidas ao choque térmico esta inibição foi por volta de 91%. Na presença de antimicina (2 μ M) e KCN (10 mM), que inibem a CRC e a PAR, a respiração da suspensão controle (25°C) foi reduzida em 92%, enquanto que nas células estressadas esta inibição foi de 78%. Estes resultados indicam que o choque térmico promoveu alterações significativas na capacidade respiratória da AOX. O aumento da inibição respiratória observada na presença de antimicina e BHAM e a sua diminuição após a adição de antimicina e KCN sugerem que a atividade da proteína foi aumentada nas células submetidas ao estresse térmico. A presença de BHAM e KCN, que inibem a AOX e as citocromo *c* oxidases da CRC e PAR, fez com que a respiração fosse inibida completamente nas duas condições experimentais (ver esquema 1).

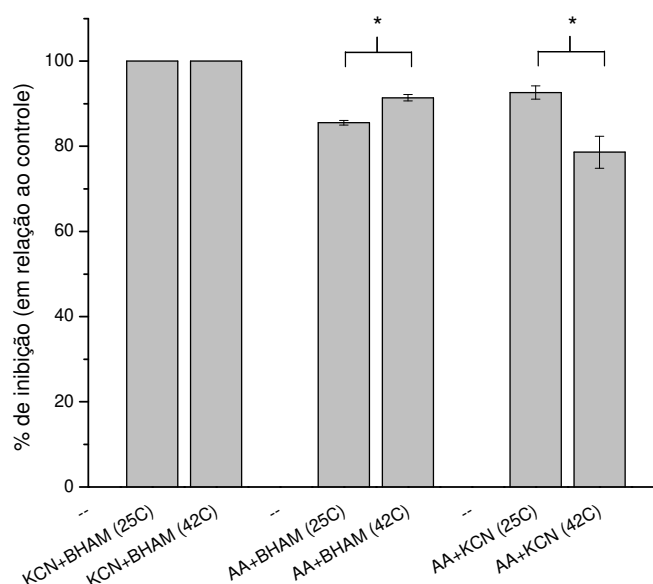


Figura 11- Efeito dos inibidores da cadeia respiratória nas células de *C. albicans*.

A respiração foi medida nas mesmas condições da figura 1 nas células incubadas a 25°C e 42°C. Os valores mostrados são as médias $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes. Os asteriscos representam as diferenças significativas em relação aos grupos comparados ($p < 0.05$).

5- DISCUSSÃO

A levedura *C. albicans* é um patógeno oportunista e maior responsável por infecções fúngicas que acometem os seres humanos (Cavalheiro et al., 2004). Uma das características cruciais deste microorganismo é a sua habilidade de sobreviver em diferentes ambientes do hospedeiro, como cavidade oral, trato intestinal e sistema vascular. A capacidade de proliferação da levedura em diferentes *habitats* está intimamente relacionada à sua versatilidade e rápida adaptação a condições ambientais distintas (Romani et al., 2003). Estes fatores têm sido descritos como os mais importantes no desenvolvimento de virulência da espécie (Soll, 2002).

A complexidade das interações entre a levedura e seu hospedeiro sugere que o fungo possui vários mecanismos que possibilitam a sua adaptação, sendo que esta plasticidade é expressa em vários graus. Ao nível celular, a *C. albicans* é capaz de mudar sua morfologia, aumentando sua aderência, penetração nos tecidos e virulência (Lo et al., 1997). Adicionalmente, o microorganismo pode ainda ajustar e modificar sua maquinaria respiratória, regulando a expressão dos diferentes complexos respiratórios mitocondriais e o fluxo de elétrons entre eles (Helmerhost et al., 2005).

Dentre o gênero *Candida*, a *Candida parapsilosis* é a espécie melhor caracterizada do ponto de vista bioenergético (Guerin e Camougrand, 1986; Guerin et al., 1989; Guerin e Camougrand, 1994; Milani et al., 2001). Esta levedura, assim como a *C. albicans*, possui uma grande relevância clínica. Nesta espécie, além da cadeia clássica dos citocromos, foram descritas duas vias alternativas para a redução do oxigênio: uma via insensível ao cianeto (AOX) e uma cadeia paralela contendo os citocromos *b* e *c* alternativos (*citob_{PAR}* e *citoc_{PAR}*) e uma oxidase terminal alternativa (*oxc_{PAR}*), sensível a altas concentrações de cianeto. Recentemente, Helmerhost et al. (2005) observaram em mitocôndrias de *C. albicans* que a adição de cianeto, subsequente à adição do BHAM, proporcionavam uma inibição respiratória de aproximadamente 90% na suspensão mitocondrial. Neste trabalho, os autores discutiram a possível existência de uma via alternativa de redução do oxigênio, além da AOX. Esta via contribuiria com apenas 10% da capacidade respiratória total. Corroborando com esta constatação experimental, nós observamos, utilizando inibidores específicos dos complexos respiratórios (Figura 1), que o oxigênio nas mitocôndrias de *C. albicans* pode ser reduzido por três oxidases

terminais, assim como descrito em *C. parapsilosis*. Este resultado indica ainda que, como observado por Helmerhorst et al. (2005), os diferentes complexos coexistem e o fluxo de elétrons pode ser redistribuído entre eles dependendo do inibidor adicionado.

A fim de observar e quantificar a contribuição destas rotas de redução do oxigênio para o crescimento do microorganismo, as células de *C. albicans* foram cultivadas na presença de inibidores específicos destas vias. Na figura 2 observa-se que a antimicina A e o KCN aboliram totalmente o crescimento da levedura, enquanto que a rotenona não preveniu o crescimento celular. Além disso, a rotenona promoveu uma inibição apenas parcial da respiração nas células intactas da levedura, enquanto que a antimicina e o KCN proporcionaram inibições bastante acentuadas (Figura 3). Por outro lado, concentrações menores de cianeto, que proporcionaram inibição parcial da respiração, não foram suficientes para inibir o crescimento da levedura, enquanto que inibições parciais promovidas pela antimicina cessaram o crescimento celular (Figura 5). Similarmente à rotenona, o BHAM promoveu uma pequena diminuição da respiração (Figura 3), porém impediu o crescimento do fungo (Figuras 2 e 5). Um ponto importante a ser ressaltado é que, embora a rotenona possua um efeito inibitório superior ao do BHAM, a inibição proporcionada por ela afetou apenas ligeiramente a proliferação celular, enquanto o BHAM preveniu fortemente o crescimento. Estes resultados indicam que a proliferação celular é dependente da inibição seletiva de determinados complexos respiratórios e não da taxa total de inibição da respiração.

Uma vez que as inibições respiratórias foram parciais, a prevenção do crescimento da levedura não pode ser atribuída à diminuição da fosforilação oxidativa, que, de fato seria ainda mais eficiente na presença do BHAM (MILANI *et al.*, 2001). Deste modo, nós inferimos que as variações na proliferação celular estavam relacionadas ao estresse oxidativo. Assim, nós medimos a geração de EROs mitocondrial, bem como os níveis de glutathiona oxidada nestas células tratadas. Através destes experimentos foi possível observar um aumento significativo da geração de EROs nas células tratadas com antimicina (Figura 8). Nós observamos ainda um aumento dos níveis de glutathiona oxidada nas células tratadas com antimicina e BHAM (Figura 9), confirmando que a diminuição da proliferação celular foi acarretada pelo desbalanço redox destas células.

Os organismos unicelulares desenvolveram diferentes estratégias, chamadas respostas adaptativas (Ruis e Schuller, 1995), para responder apropriadamente a mudanças ambientais. Variações dramáticas e repentinas, definidas como estresse, podem afetar diretamente a sobrevivência celular. Em geral, as células respondem ao estresse por meio de mudanças na expressão gênica, codificando produtos que protegerão as células destas injúrias (Estruch, 2000). A exposição das leveduras ao choque térmico, por exemplo, induz a transcrição de várias chaperonas, chamadas “heat shock proteins”, que auxiliam na estabilização das proteínas, evitando as suas desnaturações. A estabilização das proteínas é feita através da formação de um complexo chaperona-proteína, que requer a hidrólise de ATP. Assim, níveis insuficientes de ATP podem ser responsáveis pela desnaturação das proteínas, indicando que a mitocôndria pode estar diretamente envolvida na resposta ao estresse térmico. Outro ponto que reforça a participação da organela neste processo refere-se às alterações nas atividades das vias respiratórias observadas nos fungos *Cryptococcus neoformans* e *N. crassa* (Akhter et al., 2003; Steen et al., 2002, Habel et al., 1991). Nestes trabalhos, os autores observaram que as leveduras submetidas ao choque térmico apresentaram um aumento da expressão e da atividade de AOX. Corroborando com estas constatações experimentais, nós observamos um aumento da atividade da proteína nas células submetidas ao estresse térmico (Figura 11). Este incremento na atividade da AOX foi evidenciado pelo aumento da inibição respiratória proporcionados pela antimicina e BHAM (condição em que a CRC e a AOX estão totalmente inibidas) e pela diminuição da inibição na presença de antimicina e KCN (condição em que a CRC e a PAR estão inibidas, sendo que o fluxo de elétrons ocorre apenas através da AOX).

Nossos resultados indicam que a *C. albicans* possui uma cadeia respiratória ramificada, similar a outras espécies de *Candida*. Adicionalmente, nós observamos que inibições respiratórias parciais ao nível do Complexo III da CRC ou o bloqueio da atividade da AOX promovem estresse oxidativo e conseqüente inibição da proliferação celular. Nós acreditamos que o estresse oxidativo ocorre sobre estas condições devido à redução da coenzima Q. De fato, a coenzima Q parcialmente reduzida, formada durante a transferência dos elétrons, é um radical livre (radical semiquinona) capaz de gerar radicais superóxido (Kowaltowski e Vercesi, 1999, Nicholls e Ferguson, 2001).

Finalmente, nossos resultados sugerem que o Complexo III da CRC e a AOX podem ser possíveis alvos para intervenções terapêuticas contra infecções causadas pela *C. albicans*. Neste sentido, a AOX é particularmente interessante, uma vez que ela não é expressada em células de mamíferos, podendo ser um alvo mais direto para a ação de drogas, sem grandes efeitos colaterais. A AOX pode desempenhar um papel importante durante o processo de biossíntese da levedura (Veiga et al., 2000). Os esqueletos carbônicos necessários para este processo são provenientes do ciclo do ácido cítrico. Conseqüentemente, este ciclo necessita reverter-se independente do estado energético da célula. Assim, esta via dissipativa pode lidar com o excesso de equivalentes redutores, fazendo com que ocorra a transferência de elétrons através da cadeia respiratória sem a concomitante produção de ATP. A AOX possibilita ainda o funcionamento da cadeia respiratória quando a via dos citocromos está saturada ou limitada, substituindo assim a necessidade da via fermentativa (Veiga et al., 2000). Adicionalmente, nossos resultados indicam que a enzima é capaz de prevenir a geração de EROs, uma vez que a inibição da proteína pelo BHAM resultou num aumento dos níveis de glutathiona oxidada (Figura 9). De fato, foi observado recentemente que o silenciamento do gene da proteína em mitocôndrias de tabaco acarretou num aumento dos níveis das enzimas antioxidantes, tais como a glutathiona peroxidase e a MnSOD (Vanlerberghe et al., 2006).

6- CONCLUSÕES

- 6.1- Há três vias de redução de oxigênio nas mitocôndrias de *C. albicans*: a via clássica dos citocromos (CRC), a oxidase alternativa e uma via paralela, assim como observado em outras espécies de *Candida*.
- 6.2- A inibição parcial dos complexos III da CRC e da AOX previne o crescimento da *Candida albicans* devido ao estresse oxidativo, evidenciando a importância destas vias de redução do oxigênio para a viabilidade celular.
- 6.3- A atividade da AOX é aumentada nas células de *C. albicans* submetidas a choque térmico por aquecimento.
- 6.4- A AOX é um bom alvo para desenho de drogas com efeitos antifúngicos, pois sua inibição leva a eficiente controle do crescimento dessas células, devido a estresse oxidativo associado ao acúmulo de elétrons na coenzima Q.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhter S, McDade HC, Gorlach JM, Heinrich G, Cox GM, Perfect JR. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2003; 71: 5794-802.

Anaissie EJ, Bodey GP, Watts FZ, Moore AL. Emerging fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 323-330.

Argüelles JC. Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 1997; 146: 65-71.

Borecký J, Vercesi AE. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and Stress. Biosci Rep 2005; 25: 269- 289.

Bodey GP. Azole antifungal agents. Clin Infect Dis 1992; 14: 161-169.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 1973; 134: 707-716.

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem J 1976; 156: 435-444.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978; 52: 302-310.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. Arch Biochem Biophys 1977; 180: 248-57.

Camougrand NM, Cheyrou A, Henry MF, Guérin MG. The alternative respiratory pathway of the yeast *Candida parapsilosis*: oxidation of exogenous NAD(P)H. J Gen Microbiol 1988; 134: 3195-3204.

Camougrand NM, Zniber S, Guérin MG. The antimycin-A insensitive respiratory pathway of *Candida parapsilosis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning. Biochim Biophys Acta 1991; 1143: 135-141.

Carlisle PS, Gucaip R, Wiernik PH. Nosocomial infections in neutropenic cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14: 320-324.

Cavalheiro RA, Fortes F, Borecky J, Faustinoni VC, Schreiber AZ, Vercesi AE. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1455-1461.

Cesaro S, Rossetti F, Perilongo G, Rossi L, Zanesco L. Fluconazole prophylaxis and *Candida* fungemia in neutropenic children with malignancies. *Haematologica* 1993; 78: 249-251.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 281-286.

Christine C, Terrel CL. Antifungal agents: Part II – The azoles. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 78-100.

Demasi M, Silva GM, Netto LE. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. *J Biol Chem* 2003; 278: 679-685.

Elewski BE. Mechanisms of action of Systemic Antifungal Agents. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 28-34.

Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 469-486.

Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 2615-2620.

Georgopapadakou NH, Tracz JS. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol Rev* 1995; 12: 5015-5017.

Ghannoum MA, Rice, BL. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Review 1999; 12: 510-517.

Gornall AG, Bardwill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem 1949; 177: 751-766.

Guerin, B. Mitochondria, The Yeasts, vol. 4, 2nd ed., Academic Press, CA, USA, 1991.

Guérin MG, Camougrand NM, Caubet R, Zniber S, Velours G, Manon S, et al. The second respiratory chain of *Candida parapsilosis*: a comprehensive study. Biochimie 1989; 71: 887-902.

Guérin MG, Camougrand NM. The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. Eur J Biochem 1986; 159: 519-524.

Guérin MG, Camougrand NM. Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains. Biochim Biophys Acta 1994; 1184: 111-117.

Gyulkhandanyan AV, Pennefather PS. Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. J Neurochem 2004; 90: 405-421.

Habel D, Plesofsky-Vig N, Brambl R. The respiratory response to heat shock in *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett 1991; 65: 317-322.

Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim, FG. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 2002; 1556: 73-80.

Helmerhorst EJ, Stan M, Murphy MP, Sherman F, Oppenheim FG. The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. Mitochondrion 2005; 5: 200-211.

Hoek JB, Rydstrom J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem J 1988; 254: 1-10.

Huh WK, Kang SO. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. J Bacteriol 1999; 181: 4098-4102.

Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K; Izawa S, Kimura A. Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 1999; 274: 27002-27009.

Huh WK, Kang SO. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. Biochem J 2001; 356: 595-604.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 1995; 368: 73-76.

Jarmuskiewicz W, Milani G, Fortes F, Scheiber AZ, Sluse FE, Vercesi AE. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. FEBS Lett 2000; 467: 145-149.

Jezek P, Costa ADT, Vercesi AE. Evidence for an anion- translocating plant uncoupling protein in potato mitochondria. J Biol Chem 1996; 271: 32743-32748.

Joseph-Horne T, Wood PM, Wood CK, Moore AL, Headrick J, Hollomon D. Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. J Biol Chem 1998, 273: 11127-11133.

Joseph-Horne T, Babij J, Wood PM, Hollomon D, Sessions RB. New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. FEBS Lett 2000; 481: 141-146.

Kaplan RS, Pendersen PL. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem J 1983; 212: 279-288.

Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. J Pharm Pharmacol. 2004; 56: 285-289.

Kersch SJ. Diversity and origin of alternative NADH: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1459: 274-283.

Kowaltowski AJ, Castilho RF. Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1322: 221-229.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol & Med* 1999; 26: 463-471.

Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci Rep* 1997; 17: 259- 272.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; 80: 780-787.

Lo HJ, Kohler JR, Didomenico B, Loebenger D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997; 90: 939-949.

Macedo DV, Ferraz VL, Pereira da Silva L, Vercesi AE. Integration of mitochondrial function. Ca^{2+} -dependent NAD(P)^+ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. New York: Plenum 1988; 535-542.

Milani G, Jarmuskiewicz W, Sluse-Goffart CM, Schreiber AZ, Vercesi AE, Sluse, FE. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett* 2001; 508: 231-235.

Minagawa N, Yoshimoto A. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J Biochem* 1987; 101: 1141-1146.

Moller IM, Rasmusson AG, Fredlund KM. NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1993; 25: 377-384.

Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* 1978; 32: 89-93.

Nicholls D, Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 1982; 683: 57-88.

Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics* 3. London: 1-255

Oppenheim FG, Xu T, Mcmillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988; 263: 7472-7477.

Pocsi I, Prade RA, Penninckx MJ. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* 2004; 49: 1-76.

Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 415: 87-90.

Rayhan R, Xu L, Santarpia RP, Tylanda CA, Pollock JJ. Antifungal activities of salivary histidine-rich polypeptides against *Candida albicans* and other oral yeast isolates. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 51-52.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-381.

Rikhvanov EG, Varakina NN, Rusaleva TM, Rachenko EI, Voinikov VK. Sodium azide reduces the thermotolerance of respiratively grown yeasts. *Curr Microbiol* 2002; 45: 394-399.

Rocco RT, Reinert ES, Simms HH. Effects of fluconazole administration in critically III patients. *Arch Sur* 2000; 135: 160-165.

Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 338-343.

Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 440-448.

- Ruis H, Schuller C. Stress signaling in yeast. *Bioessays*, 1995; 17: 959-65.
- Siedow JN, Umbach AL. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* 1995; 7: 821-831.
- Siedow JN, Umbach AL. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1459: 432-439.
- Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 1991; 294: 158-162.
- Skulachev VP. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 431-445.
- Sluse FE, Almeida AM, Jarmuszkiewicz W, Vercesi AE. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett* 1998; 433: 237-240.
- Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* 2002; 81: 101-110.
- Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, Macdonald WK, Marra M, Jones SJ, Kronstad JW. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* 2002; 12: 1386-1400.
- Torres J, Cooper CE, Wilson MT. A common mechanism for the interaction of nitric oxide with the oxidized binuclear centre and oxygen intermediates of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 1998; 273: 8756-8766.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980; 191: 421-427.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237: 408-414.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; 17: 3-8.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.

Umbach AL, Siedow JN. The cyanide-resistant alternative oxidases from fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochim Biophys* 2000; 378: 234-245.

Wagner AM. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett* 1995; 368: 339-342.

Wagner AM, Moore AL. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep* 1997, 17: 319-333.

Vanden Bossche HP, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanism of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol* 1994; 2: 393-400.

Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT, Vanlerberghe AE, McIntosh L. Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria (Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation). *Plant Physiol* 1995; 109: 353-36.

Vanlerberghe GC, Robson CA, Yip JY. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol* 2002; 129: 1829-1842.

Veiga A, Arrabaça JD, Loureiro-Dias MC. Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190: 93-97.

Vercesi AE, Borecky J, Maia Ide G, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* 2006; 57:383-404.

Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, Zedtwitz-Liebenstein K, Georgopoulos A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J Clin Microbiol 1997; 35: 5-10.

Yamada Y, Saito H, Tomioka H, Jidoi J. Relationship between the susceptibility of various bacteria to active oxygen species and to intracellular killing by macrophages. J Gen Microbiol 1987; 133: 2015-2021.

8- APÊNDICE

Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation

Fernando Ruy · Anibal E. Vercesi ·
Alicia J. Kowaltowski

Received: 7 March 2006 / Accepted: 11 April 2006 / Published online: 12 October 2006
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract *Candida parapsilosis* mitochondria contain three respiratory chains: the classical respiratory chain (CRC), a secondary parallel chain (PAR) and an “alternative” oxidative pathway (AOX). We report here the existence of similar pathways in *C. albicans*. To observe the capacity of each pathway to sustain yeast growth, *C. albicans* cells were cultured in the presence of inhibitors of these pathways. Antimycin A and KCN totally abrogated yeast growth, while rotenone did not prevent proliferation. Furthermore, rotenone promoted only partial respiratory inhibition. Lower concentrations of KCN that promote partial inhibition of respiration did not inhibit yeast growth, while partial inhibition of respiration with antimycin A did. Similarly, AOX inhibitor BHAM decreased O₂ consumption slightly but completely stunted cell growth. Reactive oxygen species production and oxidized glutathione levels were enhanced in cells treated with antimycin A or BHAM, but not rotenone or KCN. These findings suggest that oxidative stress prevents *C. albicans* growth.

Keywords *Candida albicans* · Mitochondria · Alternative oxidase · Complex III · Coenzyme Q · Growth curve

Abbreviations AA: Antimycin A · AOX: Alternative oxidase · BHAM: Benzhydroxamic acid · CRC: Classical

respiratory chain · DCF: Dichlorofluorescein · DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) · GSH: Reduced glutathione · GSSG: Oxidized glutathione · H₂DCF, 2: 7-dichlorodihydrofluorescein · PAR: Parallel respiratory chain · ROS: Reactive oxygen species · SHAM: Salicyl hydroxamic acid

Introduction

The *Candida* genus is the main cause of fungal infections in humans (Segal, 2005), with *C. albicans* strains accounting for more than 50% of these infections. The toxicity of available antifungal agents and emergence of drug resistance are major disadvantages of current antifungal therapies (Ghannoum and Rice, 1999). Thus, development of new drugs and biological targets for their action is required. Since energy metabolism and redox state are potential targets for these drugs, it is important to study the organization of *C. albicans* respiratory chains and determine the effect of different electron transport pathways on reactive oxygen species (ROS) generation and cell viability.

While the organization of the vertebrate respiratory chain is well documented and electron transport follows a linear sequence, fungal respiration exhibits peculiar features and involves more complex and flexible pathways not yet fully elucidated (Guérin and Camougrand, 1994; Milani et al., 2001; see a schematic representation in Fig. 1). *C. parapsilosis* respiration is probably the best understood (Guerin and Camougrand, 1986; Guerin et al., 1989; Guerin and Camougrand, 1994; Milani et al., 2001). In this species, electron transport is similar, in several aspects, to plants. In both plants and *C. parapsilosis*, additional NADH dehydrogenases (internal and external, facing the mitochondrial matrix and intermembrane space) act in parallel with

F. Ruy · A. E. Vercesi
Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências
Médicas, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

A. J. Kowaltowski (✉)
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade
de São Paulo, SP, Brazil
e-mail: alicia@iq.usp.br

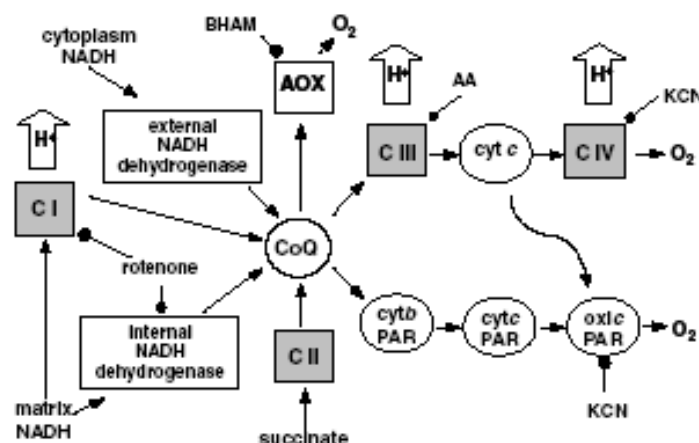


Fig. 1 Schematic representation of *C. albicans* electron transport. Electrons from NADH are transferred to proton-pumping complex I (C I) or external and internal NADH dehydrogenases. Electrons are then fed to coenzyme Q (CoQ), which can also be reduced by succinate-derived electrons channelled through complex II (C II). Electrons collected by

CoQ can be directed to O_2 through AOX, PAR or the proton-pumping CRC, containing complex III (C III) cytochrome c (cyt c) and complex IV (C IV). Rotenone inhibits complex I and the internal NADH dehydrogenase. BHAM inhibits AOX, while AA and KCN inhibit complexes III and IV, respectively. KCN also inhibits the terminal PAR oxidase.

complex I (Guerin et al., 1989). These dehydrogenases do not translocate protons (Moller et al., 1993) and are only partially sensitive to rotenone. Both plants and fungi also present AOX, which branches electron transport at the level of coenzyme Q, reducing oxygen to water and avoiding transmembrane proton transport (Guerin and Camougrand, 1986; Siedow et al., 1995; Affourtit et al., 2001). AOX activity can be assessed using hydroxamic acids such as BHAM and SHAM as inhibitors (Guerin and Camougrand, 1986; Siedow et al., 1995; Affourtit et al., 2001). In addition to energy dissipation promoted by NADH dehydrogenases and AOX, both plants and *Candida* spp present uncoupling proteins, which dissipate the electrochemical gradient, promoting higher respiratory rates (Vercesi et al., 1995; Jamuskiwicz et al., 2000; Cavaleiro et al., 2004).

In contrast to plants, Guérin et al. (1989) observed that the oxidation of exogenous substrates such as NADH and NADPH by *C. parapsilosis* mitochondria occurs in part through a pathway distinct from the classical respiratory chain (CRC) or AOX, later characterized as a parallel electron transport chain (PAR, see Fig. 1). PAR is inhibited by amital and high concentrations of myxothiazol and KCN, but not antimycin A (Camougrand et al., 1986; Guérin, et al., 1989). Guérin and Camougrand (1994) propose a respiratory chain model in which PAR functions in parallel to CRC, allowing electron flux to be deviated upstream of complex III.

Milani et al. (2001) quantified the contribution of each of the three terminal oxidases and four routes for oxygen reduction in *C. parapsilosis* mitochondria using ADP/O ratios. They verified that CRC capacity is twice as large as

AOX. On the other hand, PAR is only efficient when both CRC and AOX are blocked, leading to intense ubiquinone reduction. Indeed, PAR capacity is only one tenth of the maximal oxygen consumption rate. Interestingly, these authors found that electrons from cytochrome c in the CRC can be transferred to PAR's terminal oxidase, making electron transport even more branched and flexible in these cells. Reducing pathways are not additive, since their sum is larger than overall respiration, and the engagement of each electron transport component may be progressive according to the redox state of ubiquinone (Milani et al., 2001).

In the present study, we focus on respiratory pathways present in *C. albicans*, due to its importance as a pathogen, and study the role of each pathway to ensure yeast growth, in order to uncover possible targets for antifungal therapy. Our experimental findings suggest that partial inhibition of complex III of the CRC or inhibition of AOX prevent *C. albicans* growth by promoting oxidative stress, uncovering the importance of these pathways for yeast viability.

Materials and methods

Cell cultures and mitochondrial isolation

C. albicans (American Type Culture Collection 90028) were cultured at 37°C under vigorous aeration in complete liquid medium (2% glycerol, 2% Bacto peptone and 1% Bacto yeast extract) until the mid-exponential phase. Mitochondria were isolated and purified as described by Milani et al. (2001),

using lyticase to digest the cell wall then homogenizing the suspension and separating mitochondria through differential centrifugation. Protein concentrations were determined using the Biuret method (Gomall et al., 1949).

Cell growth measurements

Cells were incubated at 37°C with 200 rpm shaking in complete liquid medium, in the absence or presence of respiratory chain inhibitors, as indicated in the figures. Culture aliquots were collected each hour and the optical density of the suspension was measured at 530 nm using a Hitachi U-3000 spectrophotometer.

O₂ consumption measurements

Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Mitochondria were incubated in medium (28°C) containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 1% bovine serum albumin, 5 mM K-malate, 5 mM K-pyruvate and 5 mM K- α -ketoglutarate. Cells were incubated in complete liquid medium at 37°C. Other additions are indicated in the figures.

Mitochondrial ROS release

ROS production was assessed at 28°C by following the oxidation of 2,7-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively, using a F4500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer.

Oxidized glutathione measurements

The levels of oxidized glutathione were measured as described by Demasi et al. (2003). Intracellular glutathione was extracted by lysing the cells in 1 volume of glass beads and 2 volumes of 3.5% sulfosalicylic acid. The suspension was vortexed for 20 min at 4°C and centrifuged in a microcentrifuge. This procedure was repeated twice. Total glutathione and oxidized glutathione (GSSG) were determined by reaction with DTNB in the absence and presence of glutathione reductase and NADPH.

Data analysis

Traces shown are representative data of at least three similar experiments. Averages and standard errors (SEM) were determined from at least 3 repetitions. Differences between groups were considered statistically significant when

$p < 0.05$, determined using one-way ANOVA conducted by OriginPro[®] 7.5.

Results and discussion

Electron transport pathways in *C. albicans* mitochondria

To assess the capacity of electron transport pathways in the *C. albicans* respiratory chain, we measured oxygen consumption in the presence of different respiratory inhibitors. As shown in Fig. 2, mitochondrial respiratory rates sustained by NADH-generating substrates greatly diminished after the addition of 4 μ M antimycin A (AA), which blocks Complex III of the CRC but has no effect on PAR (Camougrand et al., 1991). Oxygen consumption was further inhibited by 10 mM KCN, an inhibitor of the terminal cytochrome oxidases of both CRC and PAR. The remaining cyanide-resistant respiration is completely abrogated after the addition of 2 mM BHAM, an AOX inhibitor. These results indicate that, in *C. albicans* mitochondria, oxygen can be reduced by three pathways: CRC, PAR and AOX, as observed previously in *C. parapsilosis* (Guerin and Camougrand, 1986; Guerin and Camougrand, 1994; Milani et al., 2001).

Contribution of electron transport pathways toward yeast proliferation

We investigated the capacity to ensure cellular growth of each electron transport pathway present in *C. albicans*. In

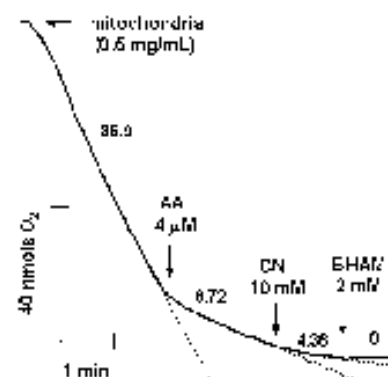


Fig. 2 *C. albicans* respiration includes AA, KCN and BHAM-sensitive pathways. Isolated *C. albicans* mitochondria (0.5 mg/mL) were added to 10 mM K-Hepes, pH 7.2, containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM K₂HPO₄, 1% BSA, 5 mM K-malate, 5 mM K-pyruvate and 5 mM K- α -ketoglutarate. AA (4 μ M), 10 mM KCN and 2 mM BHAM were added where indicated by the arrows. Numbers in parenthesis indicate O₂ consumption rates in nmols min⁻¹ mg protein⁻¹. Dotted lines represent oxygen consumption in the absence of inhibitor addition. The results shown are representative of at least three independent and similar repetitions.

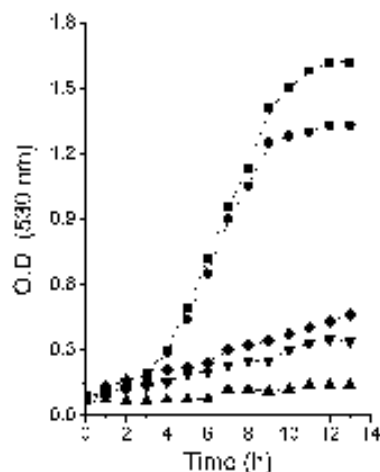


Fig. 3 Respiratory inhibitors limit *C. albicans* growth. *C. albicans* were cultured in complete liquid medium in the absence (control, ■) or presence of 2 mM rotenone (●), 2 mM AA (▲), 1 mM KCN (▼) or 2 mM BHAM (◆) as shown. Cell growth was monitored by optical density (O.D.) measurements. The results are representative of at least three independent and similar repetitions.

aerobically cultured yeast (Fig. 3), both AA (7) and KCN (8) significantly prevented cell growth when compared to a control experiment (absence of inhibitors, ■), indicating the importance of the CRC for cell survival. The presence of 2 mM BHAM (◆) also inhibited growth, evidencing the importance of AOX in this process.

Surprisingly, the presence of 2 μ M (●) rotenone did not completely prevent cellular growth, suggesting that Complex I function is not essential for *C. albicans* proliferation. *C. albicans* are probably able to oxidize cytoplasmatic substrates such as NADH, NADPH and glycerol 3-phosphate through external rotenone-insensitive dehydrogenases (Helmerhorst *et al.*, 2002; Joseph-Horne *et al.*, 2001, see Fig. 1). These NADH dehydrogenases do not promote proton pumping, essential for ATP synthesis, as indicated by lower ADP/O ratios observed using external NADH versus matrix NADH sources (Helmerhorst *et al.*, 2002). The resulting reduction in oxidative phosphorylation may be the reason for the slight, but highly reproducible, decrease in cell proliferation observed in the presence of rotenone (Fig. 3, compare rotenone-containing trace, ● to control, ■).

Next, we verified the effect on mitochondrial oxygen consumption of the high doses of respiratory inhibitors used to monitor cell proliferation in Fig. 3. We found that the addition of rotenone to isolated mitochondria was capable of promoting only a partial decrease in O_2 consumption rates (Fig. 4A), resulting in levels approximately 60% of those observed in mitochondria from cells grown in the absence of inhibitors. On the other hand, high doses of AA and KCN reduced O_2 consumption very significantly. The presence of

2 mM BHAM promoted a partial mitochondrial respiratory decrease (approximately 30%), similar to that observed in *C. parapsilosis* (Milani *et al.*, 2001).

It is interesting to note that, although rotenone has a larger effect on mitochondrial respiration than BHAM (Fig. 4A), it affects cell proliferation only slightly, while BHAM strongly prevents cell growth (Fig. 3). This indicates that not overall respiratory rates, but the specific respiratory pathway inhibited, determine cell growth. In order to compare the contribution of each electron transport pathway component equally, we titrated concentrations of each inhibitor in order to obtain O_2 consumption levels similar to those observed in the presence of BHAM (results not shown). In isolated mitochondria, we found that 0.5 μ M rotenone, 15 nM AA and 0.8 μ M KCN decreased electron transport to levels equal to those observed with saturating BHAM concentrations (Fig. 4A).

We then tested the effect of these inhibitor concentrations on respiration in intact *C. albicans* cells (Fig. 4B). The low doses of rotenone and KCN resulted in decreases in cellular O_2 consumption similar to those observed with BHAM. On the other hand, 15 nM AA inhibited cellular respiration quite significantly, and a lower concentration of 7.5 nM was used to promote respiratory inhibition similar to that observed with the other drugs.

From the values obtained in Fig. 4B, yeasts were cultured in the absence and presence of low concentrations of drugs capable of promoting comparable respiratory inhibitions. Under these conditions, 7.5 nM AA completely inhibited cellular growth (Figs. 5 and 7), evidencing the importance of functional Complex III for *C. albicans* proliferation. As noted previously, BHAM (◆) also prevented growth, demonstrating the role of AOX in this process. On the other hand, inhibition of Complex I, promoted by rotenone (●), or complex IV, promoted by KCN (▼), were not sufficient to inhibit yeast proliferation. Since the inhibition of respiration was partial in all cases, prevention of cell growth cannot be ascribed to the lack of oxidative phosphorylation, which would, in fact, be more efficient in the presence of BHAM (Milani *et al.*, 2001). Instead, we hypothesized that changes in proliferation were related to altered mitochondrial ROS release.

ROS production and increased glutathione oxidation are enhanced by complex III or AOX inhibition

ROS are naturally generated by mitochondrial respiration. An important source of these species is coenzyme Q, since semiquinone radicals formed during its redox cycle can donate an electron to O_2 , leading to the production of superoxide radicals and other ROS (see Kowaltowski and Vercesi, 1999, for review). Indeed, we observed that *C. albicans* mitochondria present an increase in steady-state ROS production, measured through DCF fluorescence increments (Rothe and

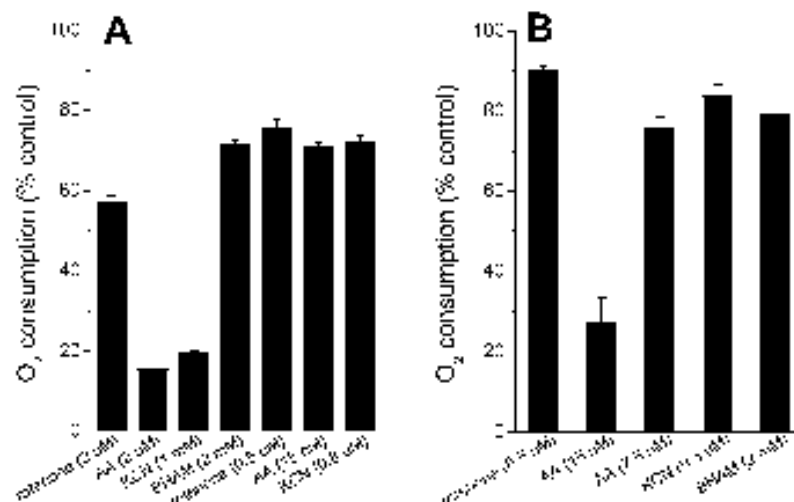


Fig. 4 Respiratory effects of different respiratory inhibitors. O₂ consumption rates were measured in isolated *C. albicans* mitochondria (Panel A) under conditions similar to those described for Fig. 2, in the presence of the respiratory inhibitors at the concentrations indicated. In Panel B, inhibitors were added to intact cells suspended in complete

liquid medium, and O₂ consumption was determined after 10 min incubation. The results are averages $\pm$ SEM O₂ consumption relative to untreated controls of at least three independent repetitions. All respiratory rates in treated mitochondria and cells were significantly different from control (100%) rates.

Valet, 1990), when treated with AA (Fig. 6A). On the other hand, rotenone and KCN did not significantly enhance DCF oxidation. This indicates that superoxide radical generation from complex I stimulated by the presence of rotenone in *C. albicans* is not as substantial as in some other tissues (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Turrens, 2003), probably due to competition between different NADH dehydroge-

nases. On the other hand, the low doses of KCN used in our experiments probably favoured the inhibition of CRC, but not PAR, which presents smaller sensitivity to KCN (Milani *et al.*, 2001). As a result, electrons from cytochrome c in CRC can still flow to PAR cytochrome c oxidase (see Fig. 1), preventing electron accumulation and leakage leading to ROS formation. Unlike KCN, AA inhibits complex III directly, leading to a more reduced state of coenzyme Q, a major source of superoxide radicals in many tissues (Kowaltowski and Vercesi, 1999). AOX inhibition should present a similar effect, since this enzyme also receives electrons directly from coenzyme Q. Unfortunately, we were not able to measure ROS release in mitochondria incubated in the presence of BHAM or SHAM due a reaction between these compounds and the probe (results not shown).

As a second parameter to evaluate redox state in the presence of respiratory inhibitors, we measured oxidized over reduced glutathione levels (GSSG/GSH). This measurement was conducted in cells grown in the presence of respiratory inhibitors, allowing for an evaluation of cellular redox state changes as a result of alterations in mitochondrial ROS release. Fig. 6B shows that cells treated with AA or BHAM presented significant increases in oxidized glutathione levels. Although rotenone or KCN also slightly increased GSSG/GSH levels relative to controls, the effect was not statistically significant.

Taken together, our results indicate that *C. albicans* present branched respiratory chains similar to other *Candida* species. We also found that partial respiratory inhibition at the level of complex III of the CRC or prevention of AOX

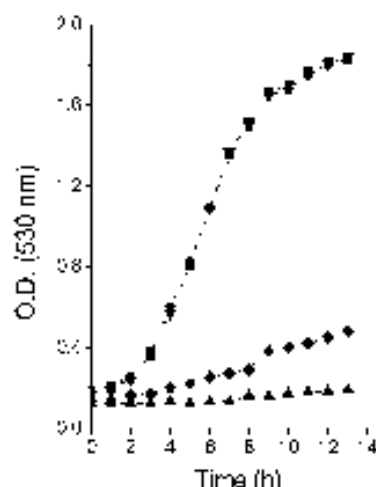


Fig. 5 AOX and partial complex III inhibition prevent *C. albicans* proliferation. *C. albicans* were cultured under conditions similar to Fig. 3 in the absence (control, ■) or presence of 0.5 mM rotenone (●), 7.5 nM AA (▲), 0.8 mM KCN (▼) or 2 mM BHAM (◆), as shown. Cell growth was monitored by O.D. measurements. The results are representative of at least three independent and similar repetitions.

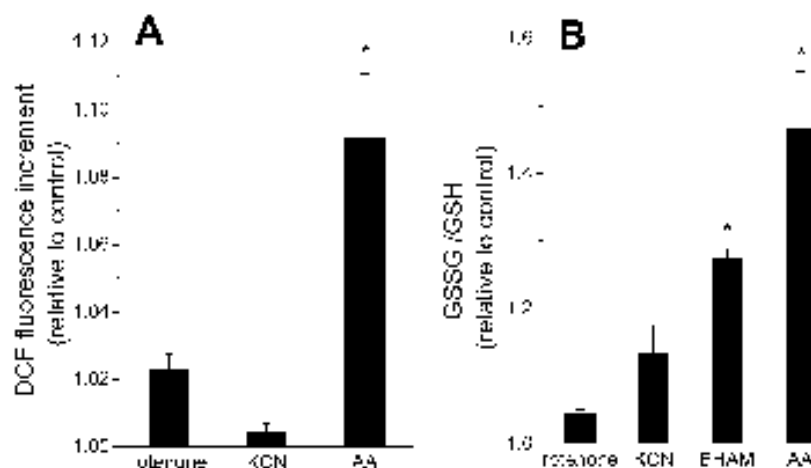


Fig. 6 AOX and complex III inhibition lead to oxidative stress in *C. albicans*. In Panel A, isolated mitochondria were incubated under conditions similar to those in Fig. 2, in the presence of $10 \mu\text{M}$ H_2DCF and $0.5 \mu\text{M}$ rotenone, $0.8 \mu\text{M}$ KCN or 7.5 nM AA. DCF fluorescence increments were determined between 5 and 20 min and normalized to

increments in fluorescence of untreated mitochondria. In Panel B, cellular GSSG/total glutathione was determined after 45 min incubation of cells in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ rotenone, $0.8 \mu\text{M}$ KCN, 7.5 nM AA or 2 mM BHAM, as indicated. Values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments, relative to control. $^*p < 0.05$ versus control.

activity leads to oxidative stress and inhibition of cellular proliferation. We hypothesize that oxidative stress occurs under these conditions due to the reduction of coenzyme Q. Indeed, partially reduced coenzyme Q, formed during physiological electron transfer, is a free radical (the semiquinone radical) capable of generating superoxide radicals within the respiratory chain (Kowaltowski and Vercesi, 1999).

Our results suggest that complex III and AOX may be attractive targets for therapeutic interventions designed to control infection by *C. albicans*. AOX is particularly interesting in this sense, since it is not expressed in mammals and can thus be targeted more readily by drugs without large side effects. AOX may have an important role as a regulator for fungal energy metabolism, promoting tricarboxylic acid cycle function even in the presence of high ATP/ADP ratios and substituting the need for a fermentative pathway (Vêiga *et al.*, 2000). In addition, this enzyme is capable of preventing mitochondrial ROS release, as suggested by our results (Fig. 6) and demonstrated in plant tissue (Popov *et al.*, 1997). Our results indicate that the uniquely branched electron transport chain in *C. albicans* has a critical role in the maintenance of cellular integrity, and that disruptions in electron flow leading to coenzyme Q reduction are associated with oxidative stress and decreased proliferation. Indeed, the ability to regulate individual complexes and partition electron flux among CRC, PAR and AOX may be the reason for the success of *Candida* spp as infectious agents, allowing these cells to modify their energetic and redox status in order to ensure survival.

Acknowledgments The authors thank Erich B. Tahara, Camille C. Caldeira da Silva, Angélica Z. Schreiber, Lúcia Lyra, Elisângela J. Gomes, Edilene S.S. dos Santos and Edson A. Gomes for technical assistance and help with experimental techniques. Professor Roger F. Castilho is gratefully acknowledged for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), including a grant to the Instituto do Milênio Redoxoma. F.R. is a doctoral student supported by a FAPESP fellowship.

Bibliography

- Affourtit C, Krab K, Moore AL (2001) Biochim Biophys Acta 1504:58–69
- Camougrand NM, Zuber S, Guérin MG (1991) Biochim Biophys Acta 1143:135–141
- Cavaleiro RA, Fortes F, Borecky J, Faustino VC, Schreiber AZ (2004) Braz J Med Biol Res 37:1455–1461
- Demazi M, Silva GM, Netto LES (2003) J Biol Chem 278:679–685
- Ghannoum MA, Rice BL (1999) Clin Microbiol Rev 12:510–517
- Gornall AG, Bardwell CJ, David MM (1949) J Biol Chem 177:751
- Guérin MG, Camougrand NM (1986) Eur J Biochem 159:519–524
- Guérin MG, Camougrand NM (1994) Biochim Biophys Acta 1184:111–117
- Guérin MG, Camougrand NM, Caubet R, Zuber S, Velours G, Manon S, Guélin E, Cheyrou A (1989) Biochimie 71:887–902
- Helmerhorst EJ, Stan M, Murphy MP, Sherman F, Oppenheim FG (2005) Mitochondrion 5:200–211
- Jarmusiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber AZ, Sluze FE, Vercesi AE (2000) FEBS Lett 467:145–149
- Joseph-Horne T, Babij J, Wood PM, Hollomon D, Sessions RB (2000) FEBS Lett 481:141–146
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999) Free Radic Biol & Med 26:463–471

- Milani G, Jarmuskiewicz W, Sluse-Goffart CM, Schreiber AZ, Vercesi AE, Sluse FE (2001) FEBS Lett 508:231–235
- Møller IM, Rasmussen AG, Fredlund KM (1993) J Bioenerg Biomembr 25:377–384
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA (1997) FEBS Lett 415:87–90
- Roth G, Valet G (1990) J Leukoc Biol 47:440–448
- Segal E (2005) Mycoses 48:3–11
- Siedow JN, Umbach AL (1995) Plant Cell 7:821–831
- Turrens JF (2003) J Physiol 552:335–244
- Veiga A, Arrabaca JD, Loureiro-Dias MC (2000) FEMS Microbiol Lett 190:93–97
- Vercesi AE, Martins IS, Silva MAP, Leite HMF, Cuccovia IM, Chaimovich H (1995) Nature 375:24