



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E EXPRESSÃO
DE POSSÍVEIS GENES RELACIONADOS À AQUISIÇÃO DE
FERRO EM *Candida tropicalis***

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E EXPRESSÃO
DE POSSÍVEIS GENES RELACIONADOS À AQUISIÇÃO DE
FERRO EM *Candida tropicalis***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F814a França, Emanuele Julio Galvão de.
Avaliação da atividade hemolítica e expressão de possíveis genes relacionados
à aquisição de ferro em *Candida tropicalis* / Emanuele Julio Galvão de França.
– Londrina, 2014.
106.f. : il.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. *Candida* – Teses. 2. Fungos patogênicos – Teses. 3. Hemólise e hemolisinas
– Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Genética – Expressão – Teses.
I. Furlaneto, Marcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III.. Título.

CDU 579:582.28

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E EXPRESSÃO DE
POSSÍVEIS GENES RELACIONADOS À AQUISIÇÃO DE FERRO EM
*Candida tropicalis***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Ricardo Sérgio Couto Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 9 de maio de 2014

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, situado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os recursos financeiros foram provenientes do CNPq, CAPES, Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

Dedico

Aos meus pais, meus exemplos de vida, que sempre me incentivaram, compreenderam tantos momentos em que estive ausente, apoiaram minhas escolhas. Agradeço por terem sempre me mostrado os bons caminhos e por estarem comigo em todos os momentos, perto ou longe ...

Às minhas queridas avó Leonor e madrinha Anilse por todo o carinho, cuidados e por suas orações que sempre me fortalecem...

À minha irmã, minha eterna melhor amiga...

Ao Luis Eduardo Lescano, que me ensina a ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos

À professora Dra. Marcia Cristina Furlaneto, orientadora deste trabalho, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo direcionamento, pela dedicação. Principalmente, agradeço pelo incentivo ao longo destes anos e por ser um exemplo de profissional, mostrando sempre comprometimento com o ensino e com a pesquisa. Guardarei sempre profunda admiração e gratidão por estes sete anos de convivência e aprendizado;

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e por todas suas sugestões e colocações que tanto me auxiliaram profissionalmente;

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pela colaboração na realização deste trabalho, pela contagiante paixão pela ciência e por todos os muitos conselhos durante estes anos, que foram lições sobre a ciência e sobre a vida;

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina;

À Universidade Estadual de Londrina;

A todos os colegas de laboratório com quem convivi durante estes anos, pela grande oportunidade de aprendizado que tive com cada um. Em especial agradeço à Alane Moralez, ao Daniel Favero e ao Marcelo Tempesta pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

Ao técnico e amigo Osvaldo Lopes, por proporcionar boas condições de trabalho e por sua simpatia;

À Martha Viviana Torres Cely pelo auxílio estatístico e por sua amizade;

Aos professores do colegiado de Ciências Biológicas da UENP-CCP, pelo apoio, incentivo e compreensão que foram fundamentais durante os meses finais da realização deste trabalho;

Especialmente agradeço a Deus pela proteção e por todas as oportunidades, sobretudo pela oportunidade de conviver com tantas as pessoas maravilhosas.

MUITO OBRIGADA!

"Tenha sempre bons pensamentos
porque os seus pensamentos se transformam em suas palavras;
Tenha boas palavras
porque as suas palavras se transformam em suas ações;
Tenha boas ações
porque as suas ações se transformam em seus hábitos;
Tenha bons hábitos
porque os seus hábitos se transformam em seus valores;
Tenha bons valores
porque os seus valores se transformam no seu próprio destino."

Mahatma Gandhi

FRANÇA, Emanuele Julio Galvão de. **Avaliação de atividade hemolítica e expressão de possíveis genes relacionados à aquisição de ferro em *Candida tropicalis***. 2014. 106f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

No Brasil e em outras regiões de clima tropical, *Candida tropicalis* é uma das principais espécies relacionadas a episódios de candidemia, provocando elevados índices de morbimortalidade. A produção de fator hemolítico é reconhecida como um possível atributo de patogenicidade dessa espécie, no entanto, tem sido alvo de poucos estudos. Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes condições de cultivo na produção de fator hemolítico e na expressão de dois genes possivelmente relacionados à aquisição de ferro do grupo heme de *C. tropicalis* - *CtHMX1*, que possivelmente codifica uma heme-oxigenase e *HLPt*, que apresenta um papel na determinação da atividade hemolítica dessa espécie. Foi verificado que o potencial hemolítico de *C. tropicalis* é influenciado pelas condições ambientais. Hemoglobina ou eritrócitos, que representam potenciais fontes de ferro, determinaram o aumento da hemólise promovida pela maioria dos isolados de *C. tropicalis* ($p < 0,05$). Por outro lado, para a maioria dos isolados, a privação de ferro não determinou diferença significativa no potencial hemolítico em comparação à condição controle (meio RPMI 1640, que também é escasso em ferro). No entanto, os índices de hemólise verificados na condição de privação foram inferiores aos constatados nos cultivos controle. A presença de plasma na concentração 7% foi associada à diminuição do potencial hemolítico de todos os isolados ($p < 0,05$), porém em concentração inferior (3,8%), o plasma não interferiu no potencial hemolítico de *C. tropicalis*. A presença de eritrócitos, independentemente de sua concentração (7 ou 3,1%), determinou aumento da promoção de hemólise pela maioria dos isolados ($p < 0,05$). Por outro lado, em 7% de sangue total não foram verificadas diferenças no potencial hemolítico da maioria dos isolados. Foi constatada filamentação diferencial de *C. tropicalis* em presença de sangue total, eritrócitos ou plasma, porém não foi verificada correlação entre a diferenciação em formas filamentosas e a atividade hemolítica dessa espécie. Os açúcares glicose, sacarose ou manose também determinaram aumento da hemólise promovida por *C. tropicalis* ($p < 0,05$), de maneira dependente da concentração. A síntese de transcritos de *CtHMX1* foi influenciada pela privação de ferro e presença de hemoglobina; as duas situações determinaram indução da expressão do referido gene ($p < 0,001$). A presença de plasma das duas concentrações testadas (7 e 3,8%) não interferiu na expressão de *HLPt*, sendo o mesmo verificado em 7% de sangue para a maioria dos isolados. Embora em presença de manose a maioria dos isolados tenha apresentado indução de *HLPt* ($p < 0,001$), o mesmo não foi verificado em presença de glicose e sacarose. Os dados deste trabalho indicam que diferentes condições de cultivo influenciam de maneiras distintas a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* e que *CtHMX1* possivelmente tem um papel na aquisição de ferro do grupo heme por esta espécie; no entanto a expressão desse gene e a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* parecem ser reguladas de maneira independente.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Hemólise. Fator hemolítico. Fator de virulência.

FRANÇA, Emanuele Julio Galvão de. **Evaluation of hemolytic activity and expression of possible genes related to iron acquisition in *Candida tropicalis***. 2014. 106p. Thesis (Doctorate Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

In Brazil and in other tropical regions, *Candida tropicalis* is a major species related to candidemia episodes, causing high morbidity and mortality. Hemolytic factor production is recognized as a possible virulence factor of this species, nevertheless, it has been subject of few studies. In this work we evaluated the effect of different culture conditions on *C. tropicalis* hemolytic activity and expression of two genes possibly involved in haem iron acquisition - *CtHMX1*, that possibly encoding a haem oxygenase and *HLPt*, which has a role in determining hemolytic activity of *C. tropicalis*. It has been found that environmental conditions influenced hemolytic activity of *C. tropicalis*. The presence of erythrocytes and hemoglobin, potential iron sources, led to increased hemolytic activity by the majority of *C. tropicalis* isolates ($p < 0.05$). For the majority of isolates iron deprivation do not determined differences in hemolytic potential compared to control condition (RPMI 1640, which is also scarce in iron). However, the hemolysis indexes verified in iron deprivation were lower than in control condition. Plasma at concentration 7% was associated with reduced hemolytic activity of all isolates ($p < 0.05$), although at lower concentration (3.8%) this blood fraction did not affect hemolytic potential of *C. tropicalis*. Regardless of its concentration (7 or 3.1 %), the presence of erythrocytes caused an increase of hemolytic activity of the majority of the isolates ($p < 0.05$). Nevertheless, total blood at 7% did not determined differences in hemolysis promoted by the majority of the isolates compared to control. It was found differential filamentation of *C. tropicalis* in presence of total blood, erythrocytes or plasma, however, there was no correlation between filamentation and hemolysis in this species. Glucose, mannose or sucrose also determined increased in hemolytic activity of *C. tropicalis* ($p < 0.05$), in a concentration-dependent manner. Iron deprivation and presence of hemoglobin determined induction of *CtHMX1* expression ($p < 0.001$). The presence of plasma (at concentrations 3.8 or 7%) did not affect the synthesis of *HLPt* transcripts; the same situation was verified in 7% of blood for the majority of the isolates. Although mannose has determined increase in the synthesis of *HLPt* transcripts for the majority of the isolates ($p < 0.001$), the same was not observed for glucose and sucrose. Our data show that culture conditions influenced hemolytic activity of *C. tropicalis* by distinct manner and that the *CtHMX1* possibly have a role in haem iron acquisition by this species; however expression of *CtHMX1* and the hemolytic activity in *C. tropicalis* are regulated independently.

Keywords: *Candida tropicalis*. Hemolysis. Hemolytic factor. Virulence factor.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Primers sequences employed in RT-qPCR and respective amplicon sizes 66

Table 2. Relative expression of the putative *CtHMX1* gene by *C. tropicalis* following grown or iron deprivation (BPS), in presence of haemoglobin or erythrocytes 66

ARTIGO 2

Tabela 1 Expressão relativa do gene *HLPt* por isolados clínicos de *C. tropicalis* cultivados em presença de sangue total humano (7%) ou plasma humano (7 ou 3,8%). Os valores são representativos de três repetições experimentais 88

ARTIGO 3

Tabela 1 Expressão relativa do gene *HLPt* por isolados clínicos de *C. tropicalis* cultivados em presença de 6% de glicose, sacarose ou manose. Os valores são representativos de três repetições experimentais 104

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** Haemolytic activity of *Candida tropicalis* clinical isolates cultured in RPMI 1640 medium alone or RPMI 1640 medium supplemented with $50\mu\text{ mol}^{-1}$ of haemoglobin (HB) or 7% of erythrocytes (ERYTH)..... 67

ARTIGO 2

- Figura 1** Atividade hemolítica (barras claras) e filamentação (barras escuras) médias de isolados de *C. tropicalis* após cultivos por 48 horas em RPMI 1640 sem suplementação ou suplementado por 7% de sangue total, 7% ou 3,1% de eritrócitos (Erit), 7% ou 3,8% de plasma. Os valores representam médias de três repetições experimentais 89
- Figura 2** Ultraestrutura do isolado 406.10 de *C. tropicalis* após cultivo por 48 horas em meio RPMI 1640 sem suplementações (A) ou suplementado de 7% de sangue total (B), 7% de eritrócitos (C) ou 7% de plasma humanos (D). Grande quantidade de matriz extracelular aderida às células é verificada nos cultivos acrescidos de sangue (cabeça de seta). Nos cultivos acrescidos de plasma observa-se matriz extracelular granular (seta). As barras representam $10\mu\text{ m}$ 90

ARTIGO 3

- Figura 1** Atividade hemolítica (%) média de isolados de *C. tropicalis* cultivados em RPMI 1640 sem suplementação de açúcares ou acrescido de diferentes concentrações de glicose, sacarose ou manose. Os valores são representativos de três repetições experimentais 105
- Figura 2** Efeito do tratamento com concanavalina A na atividade hemolítica promovida pelos sobrenadantes de cultivo dos isolados 46.10, 406.10 ou 474.10 em presença de 6% de glicose ou 6% de manose. Os valores representam porcentagem de inibição da atividade hemolítica após a incubação dos sobrenadantes com a lectina e são referentes a médias de três repetições experimentais 105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	EPIDEMIOLOGIA DAS CANDIDEMIAS	17
3.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	20
3.2.1	IMPORTÂNCIA DO FERRO NA PATOGENICIDADE MICROBIANA E ESTRATÉGIAS DE CAPTAÇÃO	22
3.2.1.1	FATOR HEMOLÍTICO	29
3.3	PAREDE CELULAR DE <i>CANDIDA</i>	31
3.4	RELAÇÃO <i>CANDIDA</i> SPP. -HOSPEDEIRO	33
	REFERÊNCIAS	36
	ARTIGOS	48
ARTIGO 1	Haemolytic factor production and expression of a putative haem- oxygenase encoding in <i>Candida tropicalis</i> are influenced by iron privation and the presence of haemoglobin and erythrocytes.....	49
ARTIGO 2	Efeito do sangue e seus componentes na produção de fator hemolítico por <i>Candida tropicalis</i> e na expressão de <i>HLPt</i> , um possível gene que codifica o fator hemolítico dessa espécie.....	68
ARTIGO 3	Avaliação do efeito de diferentes açúcares na atividade hemolítica de <i>Candida tropicalis</i>	91
	CONCLUSÕES	106

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas espécies de *Candida* tem se destacado como importantes agentes causais de infecções sanguíneas, acarretando impactos relevantes em decorrência do alto custo, dificuldade de tratamento e, principalmente, dos elevados índices de morbimortalidade. A incidência de espécies relacionadas à candidemia é variável de acordo com a região geográfica e o estado de saúde do paciente. No Brasil e em outros países da América Latina e Ásia *Candida tropicalis* tem se destacado como um dos principais responsáveis por estas infecções, superando, em alguns casos, a incidência registrada para *Candida albicans*. No geral, as infecções por *C. tropicalis* são originadas endogenamente a partir da microbiota do paciente, sendo que pacientes com câncer, neutropenia e indivíduos transplantados compõem o principal grupo de risco.

Apesar da importância clínica de *C. tropicalis*, essa espécie tem sido alvo de poucos estudos relacionados à expressão de seus fatores de virulência e patogenicidade. Em especial, são escassos os estudos abordando a capacidade de *C. tropicalis* adquirir íons ferro - uma habilidade reconhecida como fator de virulência para diversos micro-organismos tendo em vista a essencialidade desse elemento tanto para o patógeno quanto para o hospedeiro.

A capacidade hemolítica já foi descrita para diversas espécies do gênero, incluindo *C. tropicalis*. Para *C. albicans*, o fator hemolítico foi caracterizado bioquimicamente como uma manoproteína da parede celular, sendo sua fração açúcar reconhecida como responsável pela lise dos eritrócitos, facilitando o acesso à hemoglobina. A produção de fator hemolítico nessa espécie parece ser regulada pela presença de glicose, sendo também sugerido que hifas de *C. albicans* tenham maior capacidade de promoção de hemólise comparativamente à blastoconídeos.

A hemoglobina liberada após a lise dos eritrócitos é reconhecida por receptores específicos situados na superfície celular de *C. albicans*, que facilitam a internalização dessa proteína. Sequencialmente, uma heme-oxigenase atua extraíndo o ferro do grupo heme e este elemento pode ser utilizado para funções vitais da levedura.

Recentemente foi verificado que a glicose também tem um papel importante no potencial hemolítico de *C. tropicalis* e foi sugerido que o fator hemolítico dessa espécie seja uma manoproteína da parede celular, assim como evidenciado para *C. albicans*. No entanto, as bases que regulam a produção de fator hemolítico e a aquisição de ferro do grupo heme por *C. tropicalis* ainda são pouco compreendidas. Considerando-se o exposto, estudos que visem o melhor entendimento desses atributos de patogenicidade na espécie assumem especial relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo no potencial hemolítico de *Candida tropicalis*, bem como na expressão de genes dessa espécie possivelmente relacionados à aquisição de ferro do grupo heme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de privação ou presença de fontes de ferro; presença de sangue total humano e alguns de seus componentes e de diferentes açúcares no potencial hemolítico de *C. tropicalis*;

- Avaliar uma possível correlação entre a filamentação e a capacidade hemolítica de *C. tropicalis*;

- Avaliar a influência de privação de ferro, presença de hemoglobina, sangue total, plasma ou diferentes açúcares na expressão relativa dos genes *CaHMX1* e *HLPt* de *C. tropicalis*.

- Verificar uma possível correlação entre a expressão dos genes *CtHMX1* ou *HLPt* e a atividade hemolítica em *C. tropicalis*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EPIDEMIOLOGIA DAS CANDIDEMIAS

A incidência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) aumentou significativamente nas últimas décadas, especialmente em decorrência da quantidade crescente de indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados com doenças graves. Em consequência, as IFIs vêm causando elevados índices de morbi-mortalidade, sendo um dos principais fatores que levam pacientes acometidos por doenças hematológicas a óbito (KRIENGAUYAT et al., 2011; CHAMPS-BRO et al., 2011; MOR et al., 2011).

Entre os principais agentes responsáveis por estas infecções estão as leveduras do gênero *Candida*. Esses fungos são componentes da microbiota normal gastrointestinal, oral e urogenital de grande parte da população humana, no entanto podem provocar infecções oportunistas em indivíduos que apresentem funções imunológicas ou fisiológicas alteradas. Vários fatores facilitam a conversão da forma comensal de espécies de *Candida* a sua existência parasitária; diversos processos patológicos ou fisiológicos podem levar à imunossupressão e, além disso, certos traumas físicos também podem favorecer essa transição comensal/parasita. Assim, entre os principais fatores predisponentes ao desenvolvimento de infecções invasivas por *Candida* spp. estão doenças hematológicas, extremos de idade, quimioterapia de combate ao câncer, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, além das alterações nas barreiras físicas naturais do hospedeiro, como as provocadas por queimaduras e acidentes. É importante ressaltar que o desenvolvimento dessas infecções não está relacionado somente a fatores predisponentes específicos de cada paciente, mas também aos procedimentos e materiais médicos utilizados na rotina hospitalar, que são responsáveis por grande parte dos casos nosocomiais das infecções invasivas por *Candida* spp. Entre estes podem ser citadas intervenções cirúrgicas, inserção de cateteres, nutrição parenteral e

ventilação mecânica (PITET et al., 1994; SINGH, 2001; MORRELL et al., 2005; BORGES et al., 2009; ACHKAR et al., 2010; STRATMAN et al., 2010; YAPAR, 2014).

A versatilidade genética de *Candida* spp. permite que essas leveduras tenham grande habilidade de adaptar-se a diferentes microambientes e a alterações ambientais, seja em um contexto biótico ou abiótico. Em decorrência desse potencial as espécies de *Candida* são capazes de colonizar muitos sítios anatômicos distintos, os quais podem ser amplamente variados quanto ao meio fisiológico. Assim, o espectro de infecções provocadas por *Candida* spp. é muito extenso e além das severas infecções invasivas essas leveduras também podem provocar infecções superficiais (ODDS, 1994; HAYNES, 2001; CALDERONE; FONZI, 2001; KUMAMOTO; VINCES, 2005a; OKSUZ et al., 2007).

Entre as infecções invasivas, destacam-se os casos de candidemia. Apesar dos avanços nos procedimentos diagnósticos e do desenvolvimento de antifúngicos e de estratégias para prevenir a contração de candidemias no ambiente hospitalar, a incidência dessas infecções tem aumentado nas últimas décadas (PFALLER; DIEKEMA, 2007; FORTÚN et al., 2012). Seus elevados índices de incidência em quase todas as regiões demográficas têm gerado impactos relevantes em decorrência da dificuldade de tratamento, do alto custo que representam para os sistemas de saúde e principalmente por suas elevadas taxas de mortalidade, próximas a 50% em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (WENZEL, 1995; EDMOND et al., 1999; OLAECHEA et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004; SHORR et al., 2009; KETT et al., 2011; BLOSS et al., 2013; NUCCI et al., 2013).

Apenas cinco das cerca de 200 espécies de *Candida* são responsáveis por mais de 90% dos casos registrados de candidemia - são elas *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. A incidência dessas espécies é variável de acordo com a região geográfica e as condições clínicas dos pacientes. Apesar de

C. albicans ainda ser a espécie mais amplamente associada a estas infecções na maioria das regiões, sua incidência relativa vem declinando e espécies não-*albicans* tem assumido importância crescente em diversas localidades (MAVOR et al., 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2007; LEROY et al., 2010; FALAGAS et al., 2010; CHI et al., 2011; NUCCI et al., 2013; JUYAL et al., 2013; GUINEA, 2014; YAPAR, 2014).

As razões para esta alteração no padrão de distribuição das espécies ainda não são totalmente elucidadas, mas tem sido sugerido que estejam parcialmente relacionadas ao uso profilático de determinandos antifúngicos, como o fluconazol. A elevação do número de pacientes acometidos por neutropenia entre outras doenças imunossupressoras pode ter contribuído para o aumento relativo de infecções associadas a espécies não-*albicans*. Além disso, o avanço nas técnicas de identificação de espécies pode ter contribuído para a evidência da alta incidência de espécies não-*albicans* (ABI-SAID et al., 1997; NHO et al., 1997; LUO; MITCHELL, 2002; RODRIGUEZ et al., 2010; CHI et al., 2011; DIEKEMA et al., 2012; PFALLER, 2012).

No Brasil e em demais regiões de clima tropical *C. tropicalis* destaca-se como uma das principais espécies não-*albicans* relacionada a casos de candidemia, sendo que em algumas localidades é a espécie mais prevalente do gênero, superando os casos relacionados à *C. albicans* (COLOMBO et al., 2006; CHAI et al., 2010; FURLANETO et al., 2011; NUCCI et al., 2013; BERGAMASCO et al., 2013; SANTOLAYA et al., 2014). Além de sua importância clínica em países de clima tropical, uma recente revisão de estudos epidemiológicos evidenciou que a incidência de infecções provocadas por *C. tropicalis* vem aumentando mundialmente (GUINEA, 2014).

A maior parte das infecções causadas por *C. tropicalis* é originada endogenamente, a partir da microbiota do hospedeiro. Essa espécie possui considerável potencial biológico como agente oportunista em pacientes acometidos por câncer, doenças

hematológicas como a neutropenia, transplantados, além de pacientes submetidos à supressão da microbiota pelo uso de antimicrobianos ou que sofreram danos nas mucosas. Esses fatores facilitam particularmente a translocação desses micro-organismos da microbiota gastrointestinal para outros sítios anatômicos, causando infecção (KONTOYIANNIS et al., 2001; RICHARDSON; LASS-FLORL, 2008; DIMOPOULOS et al., 2008; NEGRI et al., 2012). A principal preocupação com relação ao desenvolvimento de candidemia por *C. tropicalis* é decorrente de sua elevada patogenicidade; essa espécie apresenta elevado potencial de disseminação nos seus hospedeiros e os índices de mortalidade associados à candidemia por *C. tropicalis* superam os relatados para outras espécies do gênero, incluindo *C. albicans*. Além disso, isolados dessa espécie com frequência tem apresentado menor suscetibilidade a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica comparativamente à *C. albicans* (EGGIMANN et al., 2003; KONTOYIANNIS et al., 2001; COLOMBO et al., 2007; NEGRI et al., 2012; MA et al., 2013).

Filogeneticamente, *C. tropicalis* é a segunda espécie do gênero mais próxima a *Candida albicans*, sendo precedida apenas por *C. dublinensis*, e compartilha muitos determinantes de virulência com essas espécies (CHAI et al., 2010).

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Micro-organismos patogênicos apresentam mecanismos que propiciam sucesso na colonização e infecção do hospedeiro. Assim, a maioria dos patógenos, incluindo espécies de *Candida*, expressa uma série de fatores de virulência e apresenta estratégias específicas que os auxiliam na habilidade de colonizar tecidos hospedeiros, sobrepujar suas defesas e causar infecções (HAYNES, 2001; NAGLIK et al., 2003).

A maioria das pesquisas referentes a fatores de virulência no gênero *Candida* é realizada utilizando-se *C. albicans* como modelo. No entanto existem diferenças significativas

com relação à presença de genes de virulência e sua expressão fenotípica entre as espécies do gênero. Apesar da importância clínica de *C. tropicalis* já mencionada, ainda há uma escassez de estudos relativos à expressão fenotípica e genotípica de determinantes de virulência por esta espécie (ZAUGG et al., 2001; KANTARCIOGLU; YÜCEL 2002; FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2003; DAGDEVIREN et al., 2005; OKSUZ et al., 2007).

Alguns fatores de virulência já foram relatados para *C. tropicalis* como produção de enzimas extracelulares, adesão a diferentes superfícies, formação de biofilme e *switching* fenotípico (ZAUGG et al., 2001; BIZERRA et al., 2008; SILVA et al., 2009; NEGRI et al., 2010; NEGRI et al., 2012; FRANÇA et al., 2011a; MORALES et al., 2014). Além disso, sabe-se que *C. tropicalis* pode alterar a morfologia entre três tipos celulares distintos: blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas. A capacidade de formar hifas é compartilhada com apenas outras duas espécies clinicamente relevantes do gênero, *C. albicans* e *C. dubliniensis* (CHAI et al., 2010; THOMPSON et al., 2011).

A transição blastoconídeo/formas filamentosas é uma das propriedades que podem contribuir para virulência de algumas espécies de *Candida*. As formas blastoconidiais estão amplamente relacionadas à colonização de superfícies mucosas e disseminação pelos tecidos do hospedeiro; em contraste as hifas proporcionam uma maior capacidade de invasão e escape do sistema imune do hospedeiro. Comparativamente aos blastoconídeos, as pseudo-hifas proporcionam maior facilidade na captação de nutrientes. Para *C. albicans* tem sido demonstrado que alguns genes de virulência são exclusivamente expressos por hifas; dentre estes estão alguns genes da família de proteases aspárticas secretadas (*SAP*) e genes que codificam adesinas (*ALS1*, *ALS3*, *HWPI*) (ROMANI, et al., 2003; KUMAMOTO; VINCES, 2005b; CARLISLEA et al., 2008; THOMPSON et al., 2011).

O fator hemolítico tem sido reconhecido como um novo atributo de patogenicidade em espécies de *Candida*, incluindo *C. tropicalis*, possibilitando a lise dos

eritrócitos e acesso à hemoglobina, a qual pode atuar como fonte de ferro para o micro-organismo. No entanto, esse possível determinante de virulência tem sido alvo de pouquíssimos estudos e conseqüentemente os mecanismos relacionados à produção e regulação da expressão do fator hemolítico por espécies de *Candida* ainda são pouco compreendidos (MOORS et al., 1992; MANNNS et a., 1994; LUO et al., 2001; FAVERO et al., 2014).

3.2.1 IMPORTÂNCIA DO FERRO NA PATOGENICIDADE MICROBIANA E ESTRATÉGIAS DE CAPTAÇÃO

Em decorrência da sua capacidade de captar e ceder elétrons o ferro elementar pode atuar como um co-fator essencial para diversas funções metabólicas, como reações envolvidas na cadeia respiratória, síntese de ácidos nucleicos, metabolismo de aminoácidos; sendo assim, esse elemento é requerido para a sobrevivência de praticamente todos os organismos. No entanto, a reatividade do ferro com peróxido de hidrogênio resulta na formação de radicais de oxigênio livre altamente tóxicos, os quais podem reagir com açúcares, proteínas, ácidos nucléicos e membranas celulares provocando danos. Em decorrência dessa propriedade os organismos possuem complexos sistemas para a regulação da captação e armazenamento de ferro (BYERS; ARCENEUX, 1998; MOYE-ROWLEY, 2003; SHAIABLE; KAUFMANN, 2004; DOHERTY, 2007; ALVARÉZ, 2013).

Tendo em vista a essencialidade do ferro em funções vitais, a capacidade de micro-organismos patogênicos adquirirem esse elemento é de fundamental importância para sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecções em seus hospedeiros. Desta forma, a disponibilidade do ferro representa um fator crítico na relação patógeno-hospedeiro e a captação de ferro durante processos infecciosos é considerada um atributo de virulência de bactérias e fungos (PAYNE, 1993; HOWARD, 1999; SUTAK et al., 2008).

Humanos apresentam um sistema altamente regulado para a homeostase do ferro, o que garante sua disponibilidade para funções vitais e a eliminação de sua toxicidade (DUNN et al., 2007). A maior parte (cerca de 65%) do ferro do corpo humano apresenta-se associada à hemoglobina no interior dos eritrócitos e outra parcela significativa encontra-se intracelularmente na forma de ferritina, proteínas ferro-enxofre, mioglobina entre outras. Uma pequena quantidade de ferro extracelular encontra-se associada a proteínas como a transferrina, no soro - que serve como o principal meio de distribuição de ferro - e a lactoferrina, nas secreções corporais. Estas proteínas extracelulares estão normalmente 30-40% saturadas com ferro e tem uma alta afinidade de ligação a esse elemento, o que garante que a concentração de ferro livre nos fluidos corporais permaneça em níveis extremamente baixos (cerca de 10^{-18} M), insuficientes para o crescimento microbiano. Além disso, estão presentes no soro proteínas com alta afinidade de ligação à hemoglobina e grupo heme (haptoglobina e hemopexina, respectivamente), que auxiliam no processo de retenção de ferro. Essa estratégia de retenção de ferro por proteínas do hospedeiro atua como um obstáculo a infecções por muitos micro-organismos e é referida como imunidade nutricional (BULLEN et al., 2005; DUNN et al., 2007; NOBLE et al., 2013; ALVARÉZ, 2013; CASSAT; SKAAR, 2013).

Em casos de patologias que determinem sobrecarga férrica há modificação da delicada homeostase do ferro e o aumento da disponibilidade desse elemento no organismo favorece o desenvolvimento de infecções. Pacientes com leucemia aguda frequentemente apresentam excesso de ferro livre no soro e estão mais suscetíveis a infecções por espécies de *Candida* spp. Experimentos demonstraram que esse fungo, que normalmente apresenta baixo crescimento em presença de soro de indivíduos saudáveis, tem crescimento profuso em soro de pacientes com leucemia. As transfusões sanguíneas também aumentam a suscetibilidade a infecções e é possível que a hemoglobina liberada pela lise de eritrócitos durante o processo

de transfusão seja responsável por este fato (LIONETI et al., 1964; CAROLYNE et al., 1969; BULLEN et al., 2005; BULLEN et al., 2006; ALVARÉZ, 2013).

Por outro lado, experimentos têm demonstrado que o pré-tratamento de células endoteliais ou epiteliais com quelantes férricos diminui o dano celular provocado por *C. albicans* (FRATTI et al., 1998; ALMEIDA et al., 2008). Para *C. albicans*, assim como para muitos micro-organismos, a disponibilidade de ferro serve como um importante sinal que participa do controle da expressão de certos determinantes de virulência (PAYNE, 1993; HOWARD, 1999; TIMM et al., 2003; CHEN et al., 2011). Sweet e colaboradores (1991) relataram capacidade de adesão diminuída para isolados de *C. albicans* cultivados em privação de ferro. Esses autores também relataram diminuição crescente da capacidade de formação de tubo germinativo por essas leveduras em presença de concentrações decrescentes de ferro. Baillie e Douglas (1998) verificaram que a escassez de ferro influenciou a composição celular de biofilmes de *C. albicans*. Estes autores constataram que os biofilmes formados em limitação de ferro eram compostos exclusivamente por células blastoconidiais, ao contrário do polimorfismo que é verificado em biofilmes formados em condições nutricionais normais.

Como mencionado, a disponibilidade de ferro impõe um fator limitante para a proliferação e patogenicidade de micro-organismos. Assim os micro-organismos patogênicos desenvolveram mecanismos complexos de captação de ferro a partir do hospedeiro (HOWARD, 1999; WEIBERG, 1999; RATLEDGE; DOVER, 2000; TIMM et al., 2003; CHEN et al., 2011; ALVARÉZ et al., 2013). *C. albicans* possui mecanismos independentes para captação de ferro a partir de diferentes substratos, como sideróforos, quelantes férricos variados e grupo heme (Figura 1). Estes diferentes mecanismos de captação podem atuar concomitantemente em uma célula e é provável que auxiliem a levedura a adaptar-se ao contexto fisiológico, no que se refere à variabilidade nas formas e disponibilidade do ferro

(HAMMACOTT, 2000; HEYMANN et al., 2002; HU, 2002; KNIGHT, 2002; SANTOS et al., 2003; PENDRAK et al., 2004; WEISSMAN; KORNITZER, 2004; ALMEIDA et al., 2009; CASSAT; SKAAR, 2013).

Sideróforos são pequenas moléculas orgânicas secretadas por muitos micro-organismos, as quais apresentam alta afinidade de ligação com ferro férrico (Fe^{3+}), formando complexos solúveis. Aparentemente, *C. albicans* não possui a maquinaria enzimática necessária para a síntese dessas moléculas, porém essa espécie é capaz de capturar ferro complexado a diferentes tipos de sideróforos, secretados por outros micro-organismos - uma estratégia referida como "parasitismo de ferro". Estudos demonstraram que *C. albicans* apresenta o transportador de sideróforos Sit1, o qual está envolvido na captação de ferro a partir de sideróforos. Além da participação na captação de ferro, tem sido demonstrado um papel de Sit1 na capacidade invasiva de *C. albicans*, uma vez que mutantes defectivos em Sit1 apresentam potencial de invasão de células epiteliais diminuído em comparação a cepas não-mutantes (HEYMANN et al., 2002; HU et al., 2002; LAN et al., 2004; ALMEIDA et al., 2009).

Apesar de transferrina e ferritina serem indisponíveis como fonte de ferro para alguns micro-organismos *C. albicans* é capaz de utilizar o ferro proveniente dessas moléculas. Hifas de *C. albicans* tem habilidade de se ligar à ferritina por meio de receptor (Als3) localizado na parede celular, sendo esta ligação fundamental para a posterior utilização do ferro presente nessa molécula. Além de seu papel fundamental na ligação à ferritina, a proteína Als3 também está relacionada a outros atributos de virulência em *C. albicans*, sendo que mutantes defectivos para *ALS3* são incapazes de provocar danos em células epiteliais (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; NOBLE et al., 2013).

Ainda não se sabe se *C. albicans* expressa um receptor de transferrina, no entanto, já foi evidenciado que é necessário o contato direto do fungo com essa proteína para a

utilização do ferro, o que sugere a existência de um receptor para esta molécula. Para capturar o ferro proveniente dessas proteínas do hospedeiro, bem como ferro ambiental, *C. albicans* emprega o sistema de captação redutivo, localizado na membrana plasmática da levedura. A captação de ferro pelo sistema redutivo envolve a redução extracelular de ferro, havendo conversão do ferro do estado férrico (Fe^{3+}) ao ferroso (Fe^{2+}) por uma redutase férrica. Em uma reação acoplada, o Fe^{2+} é reoxidado e importado para o interior da célula por atuação de uma ferroxidase multicobre complexada a uma permease férrica. Uma das permeases férricas codificadas por *C. albicans*, a *Ftr1*, é expressa em condições de privação de ferro e essa proteína é fundamental para a capacidade de *C. albicans* adquirir ferro em ambientes deficientes em ferro, seja em um contexto *in vitro* ou *in vivo*. A deleção de *FTR1* extermína a capacidade patogênica de *C. albicans* em modelos de infecção sistêmica em camundongos (RAMANAN; WANG, 2000; HAMMACOTT, 2000; KNIGHT, 2002; KNIGHT et al., 2005; ALMEIDA et al., 2009; NOBLE et al., 2013; ALVAREZ et al., 2013).

C. albicans também é capaz de utilizar o ferro presente no grupo heme. Essa espécie é capaz de captar a hemoglobina liberada após a lise dos eritrócitos por meio de receptores de hemoglobina específicos situados na superfície celular. A proteína *Rbt5*, que é glicofosfatidil-inositol (GPI)-ancorada à membrana plasmática, atua nesse processo por meio do reconhecimento e ligação à hemoglobina, seguido de sua internalização celular por uma via endocítica. A família de receptores de hemoglobina compreende pelo menos cinco genes (*RBT5*, *RBT51*, *WAPI/CSA1*, *CSA2* e *PGA7*); as cinco proteínas codificadas por tais genes apresentam o domínio conservado CFEM (WEISSMAN; KORNITZER, 2004; WEISSMAN et al., 2008).

Diferentes espécies do gênero *Candida* apresentam variação na capacidade de utilizar hemoglobina e hemina como única fonte de ferro. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são capazes de utilizar essas fontes de ferro com alta eficiência, enquanto *C. glabrata* e *C. krusei*

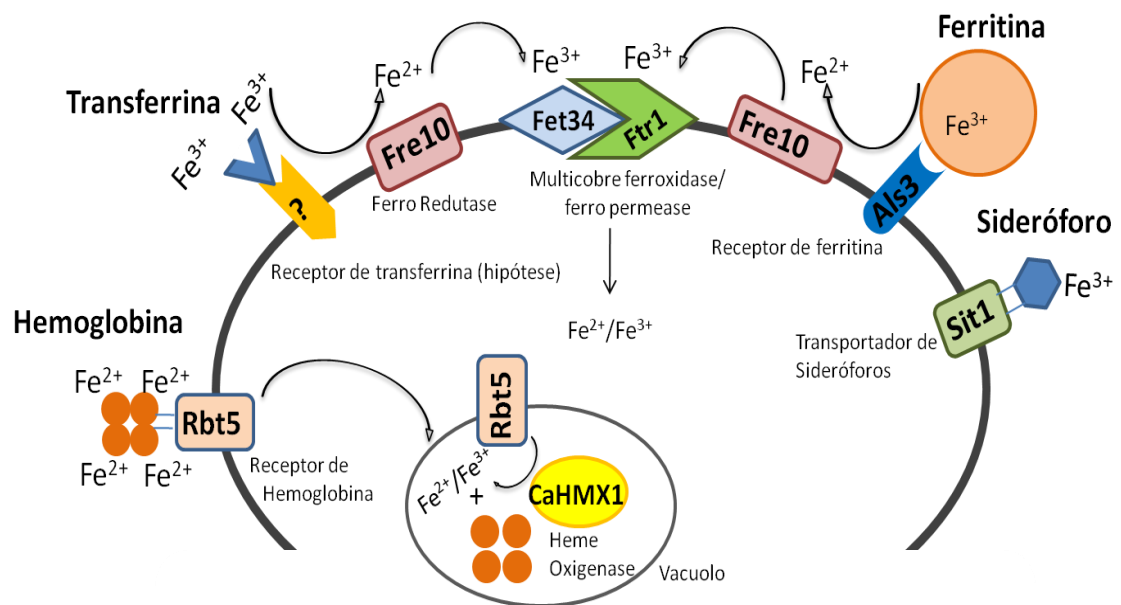
necessitam de concentrações consideravelmente mais elevadas para que possam crescer em presença dessas proteínas como única fonte de ferro. Análises por *Western blotting* do extrato protéico dessas quatro espécies revelaram em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, mas não em *C. glabrata* e *C. krusei*, a presença de uma proteína *cross-reativa* com um anticorpo anti-Rbt51 (WEISSMAN; KORNITZER, 2004).

Apesar da importância de *RBT5* na internalização da hemoglobina e, conseqüentemente, utilização de ferro do grupo heme, cepas de *C. albicans* mutantes defectivas para este gene apresentam virulência semelhante às cepas selvagens. Este fato é provavelmente conseqüente de mecanismos de aquisição de ferro compensatórios, que possibilitam que a levedura capte ferro proveniente de outras fontes, alternativas à hemoglobina (BRAUN et al., 2000; WEISSMAN; KORNITZER, 2004).

Para a liberação do ferro da hemoglobina após a sua internalização, *C. albicans* apresenta uma heme-oxigenase (CaHmx1), a qual catalisa a conversão da hemoglobina a α -biliverdina, com conseqüente liberação de ferro e monóxido de carbono. *CaHMX1* é reconhecido como um gene de virulência em *C. albicans*. Apesar de *CaHMX1* não ser um gene essencial para o crescimento de *C. albicans in vitro*, foi demonstrado que esse gene possui um importante papel na patogênese em um modelo de candidíase disseminada. Além da importância do ferro liberado na reação catalizada pela heme-oxigenase, o monóxido de carbono também tem papel relevante na proliferação da levedura em um contexto infeccioso, uma vez que essa molécula tem potencial de imunossupressão local, limitando a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, contribuindo para a patogênese da candidemia. Tem sido demonstrado que tanto a presença de hemoglobina quanto a escassez de ferro levam a indução da expressão de *CaHMX1* por *C. albicans* (SANTOS et al., 2003; PENDRAK et al., 2004; NAVARATHNA; ROBERTS, 2010).

Além de atuar como uma potencial fonte de ferro para *Candida* spp., a hemoglobina também tem um papel como sinalizador para a indução da expressão de proteínas de *C. albicans* relacionadas a adesão. A presença de hemoglobina leva a indução na expressão de receptores de fibronectina pela levedura e ainda estimula a ligação de *C. albicans* a outras proteínas do hospedeiro, como colágeno, fibrinogênio e laminina. Somado à sua atuação como indutora da expressão de alguns genes relacionados à adesão, a hemoglobina também pode estimular a expressão de outros genes relacionados à virulência de *C. albicans*. Possivelmente a hemoglobina seja reconhecida por *C. albicans* como um sinal de sua exposição a um sítio no qual a infecção disseminada possa se iniciar (PENDRAK et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de aquisição de ferro de *C. albicans*. Essa levedura apresenta mecanismos de aquisição de ferro a partir de diferentes proteínas do hospedeiro, como hemoglobina, transferrina e ferritina, assim como a partir de sideróforos secretados por outros micro-organismos.



Adaptado de NOBLE et al., 2013

3.2.1.1 FATOR HEMOLÍTICO

O fator hemolítico produzido por espécies de *Candida* promove a lise dos eritrócitos facilitando o acesso da levedura à hemoglobina. Apesar dos eficientes processos de homeostase férrica que garantem a remoção da hemoglobina livre após a lise dos eritrócitos em indivíduos saudáveis, a ocorrência de pontos localizados de hemólise em consequência da atuação do fator hemolítico pode saturar a haptoglobina presente, permitindo que a hemoglobina livre se acumule (MANNS et al., 1994; LUO et al., 2001; PENDRAK et al., 2004).

Em estudo pioneiro, Manns e colaboradores (1994) evidenciaram a capacidade hemolítica de *C. albicans* e relataram que a hemoglobina liberada após a hemólise pode restabelecer o crescimento do fungo, previamente inibido pela ação de transferrina. Esses autores ainda sugeriram que a atividade hemolítica nessa espécie seja regulada pela glicose e que a produção do fator hemolítico seja mais pronunciada em células hifais comparativamente a células blastoconidiais. Segundo reportado por Tanaka e colaboradores (1997) a quantidade de receptores de hemoglobina é significativamente maior em células hifais de *C. albicans* em comparação a blastoconidiais e apenas hifas dessa espécie tem a capacidade de utilizar hemoglobina como fonte de ferro.

Em estudo posterior, o fator hemolítico de *C. albicans* foi caracterizado bioquimicamente como uma manoproteína de parede celular, sendo evidenciado que sua fração manana liga-se à proteína Banda 3 dos eritrócitos (responsável pelo transporte de íons), promovendo a lise dessas células vermelhas (WATANABE et al., 1999).

Em 2001, Luo e colaboradores demonstraram que diversas espécies de *Candida* apresentam atividade hemolítica, entre elas *C. tropicalis*. Para os ensaios de hemólise estes autores empregaram meio Sabouraud dextrose ágar acrescido de 7% de sangue de carneiro e

de 3% de glicose, em atmosfera de 5% de CO₂. Foi relatada atividade hemolítica variável entre as diferentes espécies do gênero, sendo evidenciados dois tipos distintos de hemólise - completa e incompleta - descritas como hemólise alfa e beta, respectivamente. Essa nomenclatura foi empregada como referência à terminologia utilizada para hemolisinas alfa e beta de procariotos (BREESE et al., 1970; CAVALIERI et al., 1984). Posteriormente outros autores relataram atividade hemolítica para espécies de *Candida* utilizando metodologia semelhante à descrita por Luo e colaboradores (2001) (LINARES et al., 2007; FURLANETO-MAIA et al., 2008; NEGRI et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; SACRISTÁN et al., 2011; FRANÇA et al., 2011b).

No entanto, alguns autores que empregaram variações do ensaio de hemólise descrito por Luo e colaboradores (2001) têm demonstrado que a atividade hemolítica de *Candida* é influenciada pelas condições de cultivo. Yigit e Aktas (2009) demonstraram que a fonte de sangue utilizada influencia a hemólise promovida por espécies de *Candida*. Estes autores avaliaram a atividade hemolítica promovida por sete espécies de *Candida* cultivadas em sangue de diferentes animais (carneiro, coelho e humano) e verificaram níveis mais elevados de hemólise em presença de sangue de carneiro comparativamente às demais condições. Malcok e colaboradores (2010) evidenciaram que a presença de glicose influencia o potencial hemolítico de diversas espécies do gênero *Candida*, sendo observados maiores índices hemolíticos em cultivos suplementados com esse carboidrato. A influência da glicose na atividade hemolítica de *C. tropicalis* também foi demonstrada por Favero e colaboradores (2011).

A capacidade hemolítica de *C. tropicalis* foi evidenciada ainda em 2001, no entanto, a secreção de fator hemolítico por esta espécie foi relatada apenas recentemente (LUO et al., 2001; FAVERO et al., 2011). Foi verificado que o fator hemolítico de *C. tropicalis* não é inativado pelo calor e que sua expressão fenotípica é independente da

presença de CO₂, demonstrado diferenças marcantes com relação às hemolisinas produzidas por procariotos (FAVERO et al., 2011). Apesar de o fator hemolítico de *C. tropicalis* ainda não ter sido caracterizado em nível bioquímico, dados recentes sugerem que este fator também seja uma manoproteína da parede celular, assim como já evidenciado para *C. albicans* (FAVERO, 2012; FAVERO et al., 2014).

A regulação da expressão genotípica do fator hemolítico de *Candida* spp. é pouco compreendida. Em 2000, Lacke e colaboradores amplificaram uma sequência de DNA de *C. glabrata* similar a de genes que codificam hemolisinas de uma diversidade de organismos, variando de bactérias a nematóides. Essa sequência foi reconhecida como um possível gene relacionado à atividade hemolítica na espécie, sendo denominada *HLP* (*Hemolysin Like Protein*). Posteriormente, a sequência de *HLP* foi utilizada por Luo e colaboradores (2004) para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores empregados na detecção e análise da expressão do gene *HLP* em *C. glabrata*. Estes autores correlacionaram tal expressão com o potencial hemolítico de isolados da espécie, evidenciando um possível papel do referido gene na atividade hemolítica.

Mais recentemente Favero (2012), empregando os oligonucleotídeos iniciadores descritos para o possível gene *HLP* de *C. glabrata*, amplificou uma sequência de *C. tropicalis* que possivelmente codifica uma manoproteína de parede celular, denominada *HLPt*. Após o desenho de oligonucleotídeos iniciadores para esta sequência, análises por PCR em tempo real evidenciaram elevada correlação entre a atividade hemolítica de *C. tropicalis* e a expressão de *HLPt*, o que sugere que este gene apresente um papel na determinação da atividade hemolítica da espécie.

3.3 PAREDE CELULAR DE *CANDIDA*

A mediação inicial entre *Candida* e seu hospedeiro é dada pela parede celular da levedura. Essa estrutura apresenta plasticidade e dinamismo, uma vez que é constantemente alterada em resposta a sinais ambientais e estágios do ciclo celular. Cerca de 80 a 90% da parede celular de *Candida* spp. é composta por carboidratos, sendo presentes em sua constituição bioquímica três componentes principais: glucanas contendo ligações β -1,6 e β -1,3, quitina e manoproteínas (glicoproteínas) - em menores proporções também estão presentes proteínas e lipídeos. Quantitativamente as glucanas são os principais componentes de parede, representando de 40 a 60% do peso seco dessa estrutura. Por outro lado as quitinas são os componentes menos abundantes na parede celular. As manoproteínas representam cerca de 40% dessa estrutura; essa fração é formada por homopolímeros de D-manose, seu principal componente, em associação covalente com proteína, além de fosfato. Essas estruturas formam fibrilas que se projetam para o exterior da superfície celular (CHAFIN, 1998; MARTINEZ et al., 1998).

A expressão, distribuição, características químicas e propriedades biológicas das glicoproteínas e proteínas presentes na parede celular parecem ser dependentes de múltiplos fatores, tais como condições ambientais, morfologia celular e características intrínsecas do isolado (MARTINEZ et al., 1998; LOPEZ; RIBOT et al., 2004). Por exemplo, tem sido demonstrado que a composição da parede celular de *C. albicans* é influenciada pela presença de sangue, soro, fontes de carbono variadas e privação de ferro (SOSINSKA et al., 2008; KRUPPA et al., 2011; LOWNAM, et al., 2011; ENE et al., 2012; SORGO et al., 2013).

Além de ser essencial para diversas funções biológicas (incluindo a patogenicidade), a parede celular é também uma fonte significativa de antígenos de *Candida*. Glucana e quitinas são importantes componentes estruturais, mas aparentam ser imunologicamente inertes quando comparados às manoproteínas, os componentes mais imunogênicos da parede celular (CALDERONE, 1993; MATTHEWS; BURNIE, 1996;

LOPEZ; RIBOT et al., 2004). Tanto a fração carboidrato quanto a proteica das manoproteínas são capazes de estimular uma forte resposta imune humoral, seja quando estão compondo a parede celular ou quando liberadas para o meio extracelular. Anticorpos anti-manoproteínas são ubíquos no soro humano, pertencendo predominantemente à classe de imunoglobulinas G. A presença destes anticorpos ocorre provavelmente em decorrência da estimulação do sistema imune, ocasionada pela colonização por *Candida* (DOMER, 1989; MATTHEWS; BURNIE 1996; JONES, 1990; ZHANG; KOZEL 1998; LÓPEZ-RIBOT et al., 2004).

Diversas moléculas são liberadas por *Candida* no meio extracelular - entre estas estão enzimas, proteínas e manoproteínas, que podem atuar como fatores de virulência desses fungos. A produção de anticorpos capazes de neutralizar a ação dessas moléculas pode representar um mecanismo efetivo de defesa do hospedeiro (LOPEZ-RIBOT et al., 2004).

3.4 RELAÇÃO *CANDIDA* SPP. -HOSPEDEIRO

Situações que provocam o comprometimento brando do sistema imune do hospedeiro, como o estresse, são comumente associadas ao desenvolvimento de infecções por *Candida* spp. nas mucosas oral e vaginal enquanto o comprometimento severo do sistema imune (HIV, quimioterapias, neutropenia) pode facilitar a penetração desses micro-organismos pelas mucosas, podendo alcançar a corrente sanguínea (CALDERONE; FONZI, 2001; HUBE, 2004). Verifica-se, portanto, que o sistema imune do hospedeiro influencia não só a manifestação, mas também a severidade das infecções por *Candida*spp., podendo determinar as diferentes formas clínicas da doença. Assim, o hospedeiro tem importância fundamental na determinação do balanço entre comensalismo e patogenicidade de *Candida* (HUBE, 2004; ROMANI, 2004).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. são numerosos e abrangem desde sistemas protetores inespecíficos, representados pela imunidade inata (incluindo a imunidade nutricional, já mencionada), até mecanismos de defesa sofisticados que são especificamente induzidos durante o curso da infecção - as respostas adaptativas (celular e humoral) (ROMANI, 2004). A contribuição relativa das imunidades inata e adaptativa é amplamente dependente do sítio de infecção – a imunidade inata, por meio de macrófagos e neutrófilos, domina a proteção contra candidemia, enquanto a imunidade celular ativada, por meio de citocinas, é a principal atuante na proteção contra infecções mucosas. Evidências demonstram que anticorpos com especificidades definidas também apresentam diferentes graus de proteção contra candidiases sistêmicas e mucosas (HAN et al., 1999; MATHEWS; BURNIE, 2001; FIDEL JÚNIOR, 2002).

Em condições normais, os neutrófilos representam cerca de 60% das células brancas do sangue humano. No citoplasma dessas células há uma variedade de grânulos contendo hidrolases ácidas e peptídeos antimicrobianos. Durante os episódios infecciosos, os neutrófilos são uma das primeiras células do sistema imune a serem recrutadas para os sítios de infecção, onde apresentam um papel crucial na destruição dos micro-organismos. Essas células são capazes de fagocitar agentes invasores, os quais são mortos por mecanismos dependentes e independentes de oxigênio; espécies reativas de oxigênio atuam oxidando proteínas e ácidos nucleicos dos micro-organismos e a liberação de peptídeos e proteínas dos grânulos citoplasmáticos também participa do processo de extermínio microbiano (BRINKMAN et al., 2004; URBAN et al., 2006; BRINKMAN; ZYCHILINSKY, 2007).

Recentemente foi evidenciado um novo mecanismo antimicrobiano de neutrófilos - as armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* - NETs). Essas estruturas extracelulares são compostas por cromatina dos neutrófilos associada a proteínas granulares específicas; após a ativação dos neutrófilos por micro-organismos ocorre a

iniciação de um programa celular nessas células de defesa que as leva a morte com consequente formação das NETs. O núcleo dos neutrófilos se descondensa e a membrana intracelular se desintegra, possibilitando uma mistura de componentes nucleares e citoplasmáticos, seguido de sua liberação. As NETs proporcionam um local com elevada concentração de moléculas antimicrobianas e grânulos enzimáticos que matam micro-organismos ativamente ou previnem sua proliferação. O processo de formação dessas estruturas extracelulares é rápido, podendo ocorrer em até 10 minutos após a ativação das células de defesa. Já foi demonstrado que *C. albicans* induz os neutrófilos a formarem NETs, que envolvem as células e as matam. Esse é um importante mecanismo de atuação de neutrófilos contra esses micro-organismos tendo em vista que as células de *Candida* podem ser muito grandes (células filamentosas) para serem fagocitadas. Embora os mecanismos moleculares de ligação entre NETs e micro-organismos sejam desconhecidos, acredita-se que interações eletrostáticas entre componentes catiônicos de NETs e aniônicos dos micro-organismos exerçam esse papel (BRINKMAN et al., 2004; URBAN et al., 2006; BRINKMAN; ZYCHILINSY, 2007; FUCHS et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZON, O. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases** v. 24, p.1122-1128, 1997.
- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, p. 253-273, 2010.
- ALMEIDA, R. S.; BRUNKE, S.; ALBRECHT, A.; THEWES, S.; LAUE, M.; EDWARDS, J. E. Jr.; FILLER, S. G.; HUBE, B. The hyphal-associated adhesion and invasion Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **Plos Pathogens**, v.4, p. e1000217, 2008.
- ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1000–1012, 2009.
- ALVAREZ, F.; FERNÁNDEZ-RUIZ, M.; AGUADO, J. M. Hierro e infección fúngica invasiva. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, p. 217-225, 2013.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, J. Iron-Limited Biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2146-2149, 1998.
- BERGAMASCO, M. D.; GARNICA, M.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v. 56, p. 256–263, 2013.
- BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; QUESADA, R. M. B.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 442-450, 2008.
- BLOOS, F.; BAYER, O.; SACHSE, S.; STRAUBE, E.; REINHART, K.; KORTGEN, A. Attributable costs of patients with candidemia and potential implications of polymerase chain reaction–based pathogen detection on antifungal therapy in patients with sepsis. **Journal of Critical Care**, v. 28, p. 2-8, 2013.
- BORGES, R.M.; SOARES, L.R.; BRITO, C.S.; BRITO, D.D.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO FILHO, P. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p.431-435, 2009.
- BRAUN, B. R; HEAD, W. S.; WANG, M. X.; JOHNSON, A. D. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. **Genetics** v. 156, p. 31–44, 2000.

BREESE, B. B.; DISNEY, F. A.; TALPEY, W. B.; GREEN, J. L. Beta-hemolytic streptococcal infection: the clinical and epidemiologic importance of the number of organisms found in cultures. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 119, p. 18, 1970.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 577-582, 2007.

BULLEN, J. J. ROGERS A. H. J.; SPALDING B. P. B.; WARD, C. G. Iron and infection: the heart of the matter. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 43, p. 325–330, 2005.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; SPALDING, P. B.; WARD, C. G. Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 251-258, 2006.

BYERS, B. R.; ARCENEUX, J. E. L. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. **Metal Ions in Biological Systems**. v. 35, p.37–66, 1998.

CALDERONE, R. A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. **Trends in Microbiology**, v. 1, p. 55-58, 1993.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. v.9: 327-335, 2001.

CARLISLEA, P. L.; BANERJEEA, M.; LAZZELLB, A.; MONTEAGUDOC, C.; LÓPEZ-RIBOTB, J. L.; KADOSHA, D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, p. 599 – 604, 2008.

CAROLINE, L., ROSNER, F., & KOZINN, P. J. Elevated serum iron, low unbound transferrin and candidiasis in acute leukemia. **Blood**, v. 34, p. 441-451, 1969.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. **Cell Host & Microbe**, v.13, p. 509-519, 2013.

CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A.; SNYDER, I. S. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 48, p. 326, 1984.

CHAFFIN, W.L.; RIBOT, J.L.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 130–180, 1998.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W. WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p.282-292, 2010.

CHAMPS-BRO, B. D.; LEROY-COTTEAU, P. D. A.; MAZINGUE, P. D. F.; PASQUIER, F.; FRANÇOIS, N.; CORM, B. S. CLEMAITRE, L.; POULAIN, D. Invasive fungal infections: epidemiology and analysis of antifungal prescriptions in onco-haematology. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, p. 152–160, 2011.

CHEN, C.; PANDE, K.; FRENCH, S. D.; TUCH, B. B.; NOBLE, S. M. An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v.10, p. 118-135, 2011.

CHI, H. W.; YANG, Y. S.; SHANG, S. T.; CHEN, K. H.; YEH, K. M.; CHANG, F. Y.; LIN, J. C. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, p. 369-375, 2011.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A, C.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570–576, 2007.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. **Mycoses**, v. 48, p. 321-326, 2005.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 45-48, 2012.

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIoTIS, G. ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: Differences in Risk Factors and Outcome. **Critical Care and Trauma**, v. 106, p. 523-529, 2008.

DOHERTY, C. P. Host-pathogen interactions: the role of iron. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1341-1344, 2007.

DOMER, J. E. *Candida* cell wall mannan: a polysaccharide with diverse immunologic properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, p.33–51, 1989.

DUNN L. L.; RAHMANTO, Y. S. RICHARDSON, R. Iron uptake and metabolism in the new Millennium. **TRENDS in Cell Biology**, v.17, p.93-100, 2007.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; MCCLISH, D.K.; PHALLER, M.A.; JONES R.N.; WENZEL, R.P.; Nosocomial bloodstream infections in United State hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infectious Diseases** v. 29, p. 239-244, 1999.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non immunosuppressed patients. **Lancet Infectious Diseases** v. 3, p. 685–702, 2003.

ENE, I. V.; ADYA, A. K.; WEHMEIER, S.; BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 1319–1335, 2012.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida spp.* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e954–e966, 2010.

FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v.54, p. e816-e820, 2011.

FAVERO, Daniel. Análise da produção e expressão de fator hemolítico em *Candida tropicalis*. 2012. 91 fls. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Haemolytic factor production by clinical Isolates of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 68, p. 161-166, 2014.

FIDEL JÚNIOR, P. L. The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. **International Reviews of Immunology**, v. 21, p. 515-548, 2002.

FRANÇA, E. J. G.; FAVERO, D; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 318-321, 2010.

FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypic *switching* of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011a.

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, v. 54, p. e44 – e51, 2011b.

FRATTI, R. A.; BELANGER, P. H.; GHANNOUM, M. A.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G. Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 191-196, 1998.

FORTÚN, J., MARTÍN-DÁVILA, P., GÓMEZ-GARCÍA DE LA PEDROSA, E., PINTADO, V., COBO, J., FRESCO, G., MEIJE, Y.; ROS, L.; LUENGO, J.; AGUNDEZ, M.; BELSO, A.; SANCHEZ-SOUZA, A.; LOZA, E.; MORENO, S. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. **Journal of Infection**, v. 65, p. 64-70, 2012.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v.48, p. 62-67, 2003.

FUCHS, T. A., ABED, U., GOOSMANN, C., HURWITZ, R., SCHULZE, I., WAHN, V.; WEINRAUCH, Y.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A.; ZYCHLINSKY, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 176, p.231-241, 2007.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 595-599, 2011.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia **Clinical Microbiology and Infection**, DOI: 10.1111/1469-0691.12539, 2014.

HAMMACOTT, J. E. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. **Microbiology**, v. 146, p.869–876, 2000.

HAN, Y.; ULRICH, M. A.; CUTLER, J. E. *Candida albicans* Mannan Extract—Protein Conjugates Induce a Protective Immune Response against Experimental Candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1477-1484, 1999.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 591-595, 2001.

HEYMANN, P.; GERADS, M.; SCHALLER, M.; DROMER, F.; WINKELMANN, G.; ERNST J. F. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates

uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5246–5255, 2002.

HOWARD, D.H. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 394-404, 1999.

HU, C. J. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 30598–30605, 2002.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.,7, p. 336-341, 2004.

JONES, J. M. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p.32–45, 1990.

JUYAL, D., SHARMA, M., PAL, S., RATHAUR, V. K., & SHARMA, N. Emergence of non-albicans candida species in neonatal candidemia. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, p. 541, 2013.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p. 160-165, 2002.

KETT, D. H.; AZOULAY, E.; ECHEVERRIA, P. M.; VINCENT, J. L. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical Care Medicine**, v. 39, p. 665-670, 2011.

KNIGHT, S.A. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. **Microbiology**, v.148, p. 29–40, 2002.

KNIGHT, S. A. B.; VILAIRE, D.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5482–5492, 2005.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD I. I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical and Infectious Diseases** v. 33, p. 1676–1681, 2001.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clinical Epidemiology**, v. 3, p. 175–191, 2011.

KRUPPA, M.; GREENE, R. R.; NOSS, I.; WLOWMAN, D.; WILLIAMS, D. L.; *Candida albicans* increases cell wall mannoprotein, but not mannan, in response to blood, serum and cultivation at physiological temperature. **Glycobiology**, v. 21, p. 1173–1180, 2011.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 59, p.113-133, 2005a.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, 1546-1554, 2005b.

LACHKE, S.A.; SRIKANTHA T.; TSAI, L.K.; DANIELS; K. AND SOLL, D.R. Phenotypic Switching in *Candida glabrata* Involves Phase-specific Regulation of the Metallothionein Gene *MT-II* and the Newly Discovered Hemolysin Gene *HLP*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 884-895, 2000.

LAN, C.Y; RODARTE, G.; MURILLO, L.A.; JONES, T.; DAVIS, R.W. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1451-1469, 2004.

LEROY, O.; MIRA, J. P.; MONTRAVERS, P.; GANGNEUX, J. P.; LORTHOLARY, O. Comparison of *albicans* vs. non-*albicans* candidemia in French intensive care units. **Critical Care**, v. 14, p.R98, 2010.

LINARES, C. E. B.; LORETO, É. S. D.; SILVEIRA, C. P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 203-206, 2007.

LIONETTI, F. J.; VALERI, C. R.; BOND, J. C.; FORTIER, N. L. Measurement of hemoglobin binding capacity of human serum or plasma by means of dextran gels. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 64, p. 519. 1964.

LÓPEZ-RIBOT, J.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTINEZ, J. P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 41 p. 187–196, 2004.

LOWMAN, D. W.; ENSLEY, H. E.; GREENE, R. R.; KNAGGE, K. J.; WILLIAMS, D. L.; KRUPPA, M. D. Mannan structural complexity is decreased when *Candida albicans* is cultivated in blood or serum at physiological temperature. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2752–2759, 2011.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 2971-2974, 2001.

LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 40, p. 2860-2865, 2002.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; CHEUNG, B. P. K.; TANG, G.; Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, p. 283-290, 2004.

MA, C. F.; LI, F. Q.; SHI, L. N.; HU, Y. A.; WANG, Y.; HUANG, M.; KONG, Q. Q. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of

nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 337 - 346, 2013.

MALCOK, H. K.; AKTAS, E.; AYYILDIZ, A.; YIGIT, N.; YAZGI, H. Hemolytic Activities of the *Candida* Species in Liquid Medium. **The Eurasian Journal of Medicine**, v.41, p.95-98, 2009.

MANNS, J. A.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

MARTINEZ, J. P.; GIL, M. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CHAFFIN, W. L. J. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 121-141, 1998.

MATTHEWS, R.; BURNIE, J. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 2, p. 472-476, 2001.

MAVOR, A.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process, and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v.6, p. 863–874, 2005.

MOR, M.; GILAD, G.; KORNREICH, L.; FISHER, S.; YANIV, I.; LEVY, L. Invasive Fungal Infections in Pediatric Oncology. **Pediatric Blood Cancer**, v. 56, p.1092–1097, 2011.

MOORS, M. A.; STULL, T. L.; BLANK, K. J.; BUCKLEY, H. R.; MOSSER, D. M. A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, p. 1643-1651, 1992.

MORALEZ, A. T.; FRANÇA, E. J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v.52, p. 106-114, 2014.

MORRELL, M.; FRASER, V. J.; KOLLEF M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3640–3645, 2005.

MOYE-ROWLEY, W.S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: Similarities and differences **Eucaryotic Cell**, v.2, p. 381-389, 2003.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.

NAVARATHNA, H. M. L. P. D.; ROBERTS, D. D. *Candida albicans* haeme-oxygenase and its product CO contribute to pathogenesis of candidemia and alter systemic chemokine and cytokine expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1561-1573, 2010.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v.169, p.175–182, 2010.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

NHO, S.; ANDERSON, M. J.; MOORE, C. B.; DENNING, D. W.. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1036-1039, 1997.

NOBLE, S. M. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 708-715, 2013.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PlosOne**, v.8, p. e59373, 2013.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, p.S2-S5, 1994.

OKZUS, S.; SAHIN, I.; MUSTAFA, Y.; GULCAN, A.; YANUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.P. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Journal of Infections Diseases**, v. 60, p. 280-283, 2007.

OLAECHEA, P. M.; PALOMAR, M.; LEON-GIL, C.; ALVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; OLLA-SALAS, J.; LEON-REGIDOR, M.A.; EPCAN Study Group . Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p.323–30, 2004.

PAYNE, S.M. Iron acquisition in microbial pathogens. **Trends in Microbiology**, v.1, p.66-69, 1993.

PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 148-156, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3-S13, 2012.

PITTET, D.; MONOD, M.; SUTER, P. M.; FRENK, E.; AUCKENTHALER, R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. **Annals of Surgery**, v. 220, p. 751, 1994.

RAMANAN, N., & WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science**, v. 288, p. 1062-1064, 2000.

RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, p. 881-941, 2000.

RICHARDSON, M.; LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 5–24, 2008.

RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; MENSA, J., AYATS, J.; PAHISSA, A. Predictors of candidaemia caused by non-*albicans Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 1676-1682, 2010.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 11-24, 2004.

SACRISTÁN, B.; BLANCO, M. T.; GALÁN-LADERO, M. A.; BLANCO, J.; PÉREZ-GIRALDO, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Aspartyl proteinase, phospholipase, hemolytic activities and biofilm production of *Candida albicans* isolated from bronchial aspirates of ICU patients. **Medical Mycology**, v. 49, p. 94-97 2011.

SANTOLAYA, M. E.; ALVARADO, T.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A. L.; ZURITA, J.; TIRABOSCHI, I. N.; IRIS N.; CORTES, J. A.; THOMPSON, L.; GUZMAN, M.; SIFUENTES, J.; ECHEVARRÍA, J; NUCCI, M. Active Surveillance of Candidemia in Children from Latin America: A Key Requirement for Improving Disease Outcome. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, p. e40-e44, 2014.

SANTOS, R.; BUISSON, N.; KNIGHT, S.; DANCIS, A.; CAMADRO, J.M.; LESUISSE, E. Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. **Microbiology**, v.149, p.579–588, 2003.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 946-953, 2004.

SHORR, A. F.; TABAK, Y. P.; JOHANNES, R. S.; SUN, X.; SPALDING, J.; KOLLEF, M. H. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v. 13, p.R156, 2009.

SINGH, N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use. **Practices Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1692–1696, 2001.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681-689, 2009.

SORGO, A. G.; BRUL, S.; KOSTER, C. G.; KONING, L. J.; KLIS, F. M. Iron restriction-induced adaptations in the 1 wall proteome of *Candida albicans*. **Microbiology Papers in Press**, doi:10.1099/mic.0.065599-0, 2013.

SOSINSKA, G. J.; DE GROOT, P. W. J.; DE MATTOS, M. J. T.; DEKKER, H. L.; KOSTER, C. G.; HELLINGWERF, K. J.; KLIS, F. M. Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. **Microbiology**, v. 154, p. 510–520, 2008.

STRATMAN, R. C.; MARTIN, C. A.; RAPP, R. P.; BERGER, R.; MAGNUSON, B. Candidemia incidence in recipients of parenteral nutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, p. 282-289, 2010.

SUTAK, R.; LESUISSE, E.; TACHEZY, J.; RICHARDSON, D. R. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 261-268, 2008.

SWEET, S.; DOUGLAS, L. J. Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p.859-865, 1991.

TANAKA, W. T. H; N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350-353, 1997.

THOMPSON, D. L.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species **Eukaryotic Cell**, v.10, p.1173 – 1182, 2011.

TIMM, J.; POST, F.A.; BEKKER, L.G.;WALTHER, G.B.; WAIN-WRIGHT, H.C.; MANGANELLI, R. Differential expression of iron, carbon and oxygen-responsive

mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 14321-14326, 2003.

URBAN, C. F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal form. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 668–676, 2006.

WATANABE, T.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M. AND MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.

WEINBERG, E.D. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 46, p. 231-238, 1999.

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, p.1209–1220, 2004.

WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; CONIBEAR, E.; KORNITZER, D. An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 69, p. 201–217, 2008.

WENZEL, R.P. Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.1531–1534,1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309–17, 2004.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95- 105, 2014.

YIGIT, N.; AKTAS, E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic of *Candida* species. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p.110-119, 2009.

ZAUGG, C.; ZEPELIN, M.B.V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v.69, p. 405–412, 2001.

ZHANG, M. X.; KOZEL, T. R. Mannan-Specific Immunoglobulin G Antibodies in Normal Human Serum Accelerate Binding of C3 to *Candida albicans* via the Alternative Complement Pathway. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4845–4850, 1998.

ARTIGOS

ARTIGO 1

Haemolytic factor production and expression of a putative haem-oxygenase encoding gene in *Candida tropicalis* are influenced by iron privation and the presence of haemoglobin and erythrocytes

SUMMARY: *Candida tropicalis* is a major species of the genus associated with episodes of candidemia in tropical regions, including Brazil. The ability to produce and secrete a haemolytic factor is among the putative attributes related to *C. tropicalis* pathogenesis. This study assessed the influence of iron deprivation, and the presence of haemoglobin or erythrocytes in two possible steps related to haem-iron acquisition by *C. tropicalis*, including the production of a haemolytic factor and the expression of *CtHMX* gene, a potential orthologue to *Candida albicans* *CaHMX1*-encoded haem oxygenase. Cultures under iron deprivation were associated with lower haemolytic activity. No significant difference was observed between the haemolytic activity of most isolates under iron limitation and in cultures grown in a RPMI 1640 medium (control). All isolates grown in the presence of haemoglobin showed a significant increase ($p < 0.05$) in the production of haemolytic factor when compared to the control, the same being observed for most strains cultivated in the presence of erythrocytes. Analyses by real-time PCR revealed the induction of *CtHMX1* in *C. tropicalis* cultures under iron deprivation or in the presence of haemoglobin. On the other hand, the presence of human erythrocytes in *C. tropicalis* cultures resulted in *CtHMX1* repression. Our data suggest that the production of haemolytic factor and the expression of *CtHMX1* by *C. tropicalis* are differently regulated under specific culture conditions.

Keywords: Haemolysis, iron sources, *C. tropicalis* *CtHMX1*-encoded haem oxygenase

INTRODUCTION

Species of *Candida* have emerged as important agents of bloodstream infections, causing substantial mortality (Caeiro & Riera, 2014). The distribution of species associated with these infections varies according to geographic region, with *Candida tropicalis* being one of the main causal agent of candidemia in Latin America and Asia (Falagas *et al.*, 2010; Kothavade *et al.*, 2010; Furlaneto *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Nucci *et al.*, 2013). Besides their high incidence, the clinical importance of *C. tropicalis* candidemia is also associated with high rates of morbidity and mortality that may exceed those reported for other *Candida* species, including *C. albicans* (Kontoyiannis *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2007).

Despite its undoubted epidemiological importance, there are few studies examining the virulence attributes of *C. tropicalis*, in particular its ability to promote haemolysis, a putative virulence factor in *Candida* species.

The production and secretion of haemolytic factor by *Candida* species was initially demonstrated with *C. albicans*. In this species, the haemolytic factor was characterised as a mannoprotein, with its sugar fraction identified as a cell-wall mannan. This fraction has the ability to bind to the erythrocyte membrane, causing its rupture and consequent release of haemoglobin, a source of iron for the yeast (Manns *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1999). In *C. albicans* the cell membrane protein Rbt5 is responsible for the binding and internalisation of haemoglobin (Weissman & Kornitzer, 2004; Weissman *et al.*, 2008). The extraction of iron from the haem group occurs by the action of a haem-oxygenase named CaHmx1 (Santos *et al.*, 2003).

Concerning *C. tropicalis*, Luo *et al.* (2001) were the first to evaluate the haemolytic activity of isolates on blood agar. We have firstly demonstrated that haemolytic factor is released in the culture supernatant of *C. tropicalis* isolates (Favero *et al.*, 2011) and that it is produced by

different isolates independent of their clinical origin (França *et al.*, 2010; Favero *et al.*, 2011). Furthermore, we demonstrated that the haemolysis promoted by *C. tropicalis* occurs in a glucose-dependent manner (Favero *et al.*, 2011). Although *C. tropicalis* haemolytic factor has not yet been characterised at a biochemical level, we have recently suggested that it may be a mannoprotein, similarly to that described for *C. albicans* (Favero *et al.*, 2014).

In this study we assessed the effect of iron deprivation, and the presence of haemoglobin or erythrocytes in the production of haemolytic factor by *C. tropicalis* and on the expression of a putative gene encoding a haeme oxygenase in this species named *CtHMX1* in analogy to its *C. albicans* ortho

logue (*CaHmx1*). Our data suggest that the production of haemolytic factor and the expression of *CtHMX1* are independently regulated, since the increased haemolytic activity and induction of *CtHMX1* were determined under distinct culture conditions.

METHODS

***Candida* isolates and identification.** *Candida tropicalis* isolates (46.10, 207.10, 236.10, 406.10 and 474.10) were recovered from bloodstream infections (BSIs) of different patients. This isolates were maintained as glycerol stock cultures at -80° C on the Fungal Genetics Laboratory, University of Londrina, Brazil. The isolates were presumptively identified onto CHROMagar® *Candida* agar (CA; CHROMagar, Paris France) according to manufacture's instructions. Identification was confirmed by PCR using species-specific forward primers as described by Furlaneto *et al.* (2011). Briefly, genomic DNA was extracted from 3 mL of overnight culture centrifuged at 1200xg. Pellets were resuspended in 200 µL of lyses buffer (10mM Tris, pH 8.0 containing 2% v/v triton-X-100, 1% w/v SDS, 100 mol l⁻¹ NaCl, and 1 mol l⁻¹ EDTA) along with three glass beads. The suspension was vortexed for 3 min. The

lysate was deproteinized with a mixture containing phenol, chloroform, and isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA from the aqueous phase was precipitated with 2.5 volumes of chilled ethanol, washed with 70% (v/v) ethanol, dried and resuspended in 10 μL of distilled water. For the optimum PCR conditions, a reaction volume of 20 μL contained 100 mol l^{-1} of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mol l^{-1} magnesium chloride, 10 pmol of each primer, 10% of the reaction volume of 10 x Taq buffer, 0.5 U of Taq polymerase (Invitrogen), and 10 ng of DNA template. Negative controls were performed with sterile deionized water in place of the template DNA. Reaction mixtures were subjected to an initial denaturing cycle of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min (denaturation), 60°C for 1 min (annealing), and 72°C for 1 min (elongation).

Haemolytic activity from culture supernatant. The haemolytic activity from the culture supernatant was analyzed as described by Favero *et al.* (2011), with some modifications. The isolates were precultured in RPMI 1640 medium (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) at 37°C for 18 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile PBS buffer and a yeast suspension (10^4 cells ml^{-1}) was inoculated in RPMI 1640 medium without supplementations or supplemented with: 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of iron chetator bathophenanthroline disulphonic acid (BPS) (Acros Organics, Geel, Belgium), 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of human haemoglobin (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) or 7% of fresh human erythrocytes collected from healthy adult. These suspensions were cultured at 37°C for 48 h. Following growth, the cultures were filtered in 0.22 μm membranes (Millipore MILLEX GV, Billerica, MA, USA) and the supernatant were freeze-dried and concentrated 2.5-times by eluting in PBS buffer. The culture supernatant and red blood cells (RBCs) suspended in RPMI 1640 medium (1×10^8 cells ml^{-1}) were mixed at a 1:1 (v/v) ratio, and incubated at 37°C for 18 h. After the incubation, samples were centrifuged at 1,000xg for 2 min. Absorbance of the

supernatant was determined at 405 nm. The haemolysis was calculated according to the equation: Haemolysis (%) = 100 - [(Ap-As)/(Ap-An)x100]; where Ap, As and Ac are the absorbance of the positive control, test sample and negative control, respectively. The positive control was obtained by adding SDS (0.6%) to the samples and the negative control was prepared by the absence of inoculum to the media. The assay was conducted in triplicate on three separated occasions.

Total RNA extraction and cDNA synthesis. *C. tropicalis* isolate 474.10 was grown in RPMI 1640 medium alone (control) or RPMI 1640 supplemented with BPS (100 and 50 µM), human haemoglobin (1 and 0.125 µg ml⁻¹) or human erythrocytes (7 and 4.5%). After 6 h cultures in each condition, yeast cells was harvested and the cell pellet was subjected to RNA extraction by using EZ-10 Spin Columns Total RNA Minipreps Super Kit (BIO BASIC INC, Markham, Ontario, Canada), according to manufacturer's instruction. Reverse transcription was carried out using 500 ng total RNA previously incubated at 64°C for 10 min and snap-cooled on ice for 2 min to denature. First-strand cDNA was synthesized by addition of MgCl₂ (4 mol l⁻¹), 2 µl of 10x PCR Buffer, dNTP mixture (200 µ mol l⁻¹), Oligo (dT)12-18 primer (0.4 µ mol l⁻¹), RNase OUT (4 U) and reverse transcriptase RT M-ML V (0.5 U) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The mixture was incubated at 42°C for 60 min. Synthesis reactions were performed in a Tc 3000system (Techne, Cambridge, UK).

Primers design for *CtHMX1* gene. An alignment of *C. albicans* *CaHMX1* nucleotide sequence and *C. tropicalis* genome was performed by using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *C. tropicalis* nucleotide sequence obtained was utilized for primers design using Genne Runner 3.05 software

(<http://www.generunner.com>). Melting temperature of the primers designed is 52°C and their amplification product presents 153 base pairs. Primer specificity was checked by BLAST analysis searches.

Real-time PCR assay. Real-time PCR (LightCycler Nano System; Roche, Mannheim, German) was used to determine the relative levels of *CtHMX1* mRNA transcripts, with β -actina (*ACT*) as a reference housekeeping gene (Table 1). Each reaction consisted of a working concentration of Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 20 μ mol l⁻¹ of each forward and reverse primer and cDNA, in a final reaction volume of 20 μ l. Negative controls (water) were included in each run. The mixture was subjected to the following amplification program: 2 min at 50°C; 5 min at 95°C; 40 cycles at 94°C for 30 s, 52°C for 30 s and 72°C for 1 min, with an additional extension (72°C, 10 min). Melting curve analysis was performed for each sample to assure that a single product was amplified in each reaction. Each reaction was performed in triplicate.

Statistical analysis. Kruskal-Wallis test was used to evaluate the significant differences in haemolytic activity promoted by the isolates grown in each condition tested, by applying BioStat 5.0 software. In this test, $p < 0.05$ was considered as statistically significant. The Relative Expression Software Tool (REST 2009) was used to determine the relative expression of the *CtHMX1* gene in different culture condition evaluated. The gene expression in the test situations was considered significantly different from control when $p < 0.001$.

RESULTS

Haemolytic activity of *C. tropicalis* under iron deprivation and in the presence of haemoglobin and erythrocytes

The influence of iron deprivation and presence of iron sources (human haemoglobin or erythrocytes) in the haemolytic potential of *C. tropicalis* was evaluated in this study. Cultures in RPMI 1640 medium alone were used as experimental control. Haemolytic activity was observed for all isolates under different culture conditions tested, however, distinct haemolysis levels were observed (Fig. 1). The lowest values of haemolytic activity were observed in cultures under iron deprivation, ranging from 4.3 to 6%. The haemolysis promoted by most strains (80%) under this condition did not differ from those cultured in RPMI 1640 medium.

On the other hand, higher haemolytic activity was observed in haemoglobin-supplemented cultures, with haemolytic potential ranging from 13 to 22.5% (Fig. 1). Under this condition, all isolates showed a significant increase in the haemolytic potential compared to control cultures ($p < 0.05$), the same occurring for most isolates in cultures supplemented with erythrocytes. Isolate 236.10 showed distinct results on the levels of haemolysis under different culture conditions. This isolate had no difference of haemolytic potential in cultures supplemented or not with erythrocytes. Furthermore, this isolate showed a significant reduction in haemolytic potential under iron deprivation, when compared to the control.

No differences were observed in the haemolytic activity of isolates in the presence of haemoglobin or erythrocytes. However, the haemolytic potential of isolates in both conditions differed from the iron-deprived cultures ($p < 0.05$).

Putative *C. tropicalis* haem-oxygenase encoding gene (*CtHMX1*)

A *C. tropicalis* orthologue gene to *CaHMX1*, which encodes a haem-oxygenase in *C. albicans*, was identified by employing BLASTn/GenBank analyses. A potential gene of *C. tropicalis* (GenBank access number: XM_002549959.1) exhibited 82% of similarity with *CaHMX1* nucleotide sequence (GenBank access number: XM_713942.1), score 628 and *E* value 5^{-179} with coding sequence similar to haem-oxygenases. Furthermore, the amino acid sequence corresponding to this gene is very similar to haem-oxygenases and haem-binding proteins from other *Candida* species (BLASTp, GenBank) such as *C. albicans* (78% similarity), *C. dublinensis* (81%) and *C. orthopsilosis* (75%), as well as showing a 37% similarity with the haem-oxygenase *HMX1* from *Saccharomyces cerevisiae*. The search for conserved domains in the GenBank database revealed that the sequence XM_002549959.1 has the HemeO domain, also present in *CaHMX1* and in sequences encoding haem oxygenases from diverse organisms.

These analyses support the hypothesis that the sequence of nucleotides in *C. tropicalis* (XM_002549959-1) is a potential orthologue to *C. albicans* *CaHMX1*-encoded haem oxygenase. We named it *CtHMX1* in analogy to its *CaHMX1* orthologue. The *CtHMX1* nucleotide sequence was used for in silico design of gene-specific oligonucleotide primers (Table 1).

***CtHMX1* gene expression under iron deprivation and in the presence of haemoglobin and erythrocytes**

Prior to real time PCR (qPCR) assays, we employed the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to verify the primers quality. These analyses indicated that each primer pair was specific for the *CtHMX1* and *ACT* *C. tropicalis* genes, and would not cross-react with sequences from other organisms (data not shown). The absence of nonspecific amplification

was confirmed for each real-time PCR reaction by the melting curve, which showed a single peak in all reactions. In the absence of *C. tropicalis* cells, different culture media used for the analysis of *CtHMX1* expression showed no amplification in real-time PCR reactions, confirming the specificity of the oligonucleotide primers.

Table 2 shows *CtHMX1* expression levels after cultivation of *C. tropicalis* isolate 474.10 under iron deprivation, and in the presence of human haemoglobin and erythrocytes, compared to cultures grown in a RPMI 1640 medium without supplementation. Significant induction ($p < 0.001$) of *CtHMX1* expression under iron deprivation and in the presence of haemoglobin was observed. Iron deprivation has determined more than a four-fold increase in the synthesis of *CtHMX1* transcripts by *C. tropicalis*; in the presence of haemoglobin, *CtHMX1* increased by more than twice the synthesis of transcripts. Considering the cultures under iron deprivation, the highest induction was observed with $100 \mu \text{mol l}^{-1}$ BPS ($p < 0.05$). In the presence of haemoglobin, the highest induction value of *CtHMX1* expression was determined for the cultures added of $0.125 \mu \text{g ml}^{-1}$ of this protein.

Significant repression of *CtHMX1* was observed in cultures grown in the presence of erythrocytes ($p < 0.001$); different concentrations of these blood cells led to a two-fold repression of gene expression.

DISCUSSION

Although the production of haemolysin by prokaryotes has been widely studied, little is known about haemolytic molecules produced by fungi. Luo *et al.* (2001) first described the production of a haemolytic factor by *C. tropicalis*. Our group recently showed that the haemolytic factor of *C. tropicalis* is not inactivated by heat and its phenotypic expression is

not influenced by increased atmosphere of carbon dioxide (Favero *et al.*, 2011), differently to found in prokaryotes (Njoku-Obi *et al.*, 1963; Haque & Baldwin, 1964).

Two culture conditions evaluated in this study (RPMI 1640 alone and RPMI 1640 supplemented with BPS) provide a limited iron environment for the yeast, as iron is scarce in RPMI 1640 (Yuan *et al.*, 1995). Our results revealed that the iron limitation was associated with reduced production of haemolytic factor by *C. tropicalis*. As previously cited, *C. albicans* haemolytic factor is known to be a cell wall mannoprotein (Watanabe *et al.*, 1999) as well as suggested by *C. tropicalis* haemolytic factor (Favero *et al.*, 2014). Studies have shown that the lack of iron affects cell wall composition in *C. albicans* (Paul *et al.*, 1989; Sosinska *et al.*, 2008; Sorgo *et al.*, 2013). Our results suggest that the amount of mannoprotein with haemolytic capacity released in *C. tropicalis* culture medium is reduced in situations of iron limitation.

The low haemolytic activity of *C. tropicalis* isolates grown under iron limitation may also indicate that an alternative haem uptake mechanism may be used by the yeast, similarly to found for *C. albicans*. It is known that besides the ability to acquire iron from the haem group, *C. albicans* has at least two independent mechanisms for iron uptake from the host, such as, the internalisation of iron present in siderophores produced by other microorganisms and the reductive uptake system, which enables iron uptake from ferric chelates, such as transferrin (Hammacott, 2000; Heymann *et al.*, 2002; Hu, 2002; Knight, 2002; Almeida *et al.*, 2009). These mechanisms are induced by the yeast under iron limitation (Lesuisse *et al.*, 2002). Such strategies of iron uptake have not yet been described for *C. tropicalis*. However, our hypothesis is supported by the occurrence of a putative *C. tropicalis* gene encoding a ferric permease connected to the plasma membrane which is highly similar to the *C. albicans* *FTR1* gene related to the reductive pathway of iron uptake (Butler *et al.*, 2009).

To our knowledge, this is the first study evaluating the effect of iron limitation on the production of haemolytic molecules by fungi. However, it has been observed for *C. albicans* that this nutritional status is associated with a reduction in the phenotypic expression of virulence factors. Studies have reported that, when grown under iron limitation, *C. albicans* has decreased adhesion, germ tube formation and cytotoxicity, as well as absence of filamentous forms in biofilms (Sweet *et al.*, 1991; Baillie & Douglas, 1998; Almeida *et al.*, 2008).

Our data also showed that the phenotypic expression of haemolytic factor by *C. tropicalis* is differently regulated from haemolysins produced by bacteria cells where iron deprivation is associated with the induction of haemolysin production (Cowart & Fosters, 1981; Stoebner & Payne, 1988; Mittal *et al.*, 2008).

The high levels of haemolysis promoted by *C. tropicalis* grown in the presence of haemoglobin may indicate that this protein stimulated the phenotypic expression of virulence attributes by the yeast including the haemolytic molecules. For *C. albicans*, it has been shown that haemoglobin, released via erythrocytes lyses, regulates expression of genes associated with infection (Pendrak *et al.*, 2004a). Furthermore, the increase in haemolysis levels, despite the presence of free haemoglobin in the medium, may be associated with slow kinetics in the metabolism of this molecule and consequent release of complexed iron, which causes delay in the uptake of available iron. A process involving several steps occurs in *C. albicans* from the recognition of haemoglobin to the access to its ferric ions. Initially, the yeast binds with haemoglobin via specific receptors and the protein is internalised via an endocytic pathway. Once internalised into vacuoles, haemoglobin is hydrolysed and the haem groups are released, with a haem oxygenase involved in the iron extraction (Santos *et al.*, 2003; Weissman *et al.*, 2008).

Currently, only few studies have been conducted to evaluate the influence of erythrocytes on *Candida* spp. virulence, and this is the first report on the effect of erythrocytes in the haemolytic activity of *Candida* spp. A high percentage of filamentous forms was observed in cultures supplemented with erythrocytes and haemoglobin (data not shown), which may have interfered with the haemolytic potential of the isolates. Fradin *et al.* (2005) showed that the presence of erythrocytes induces the transition blastoconidia-hypha in *C. albicans*. According to Manns *et al.* (1994), *C. albicans* hyphal cells are associated with higher haemolysis levels than blastoconidial cells.

Most *C. tropicalis* isolates showed the same pattern of haemolytic activity in different study conditions. However, interspecific variations were observed demonstrating that the production of haemolytic factor in different microenvironments can be regulated in an isolate-dependent manner. Isolate-dependent variations in the production of other virulence traits have already been observed for *C. albicans* (Copping *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2007).

In silico analyses of *C. tropicalis* *CtHMX1* gene revealed high nucleotide sequence similarity to *C. albicans* *CaHMX1*; besides, these two sequences have the same conserved domain (HemeO) present in genes encoding haem-oxygenases in various organisms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Iron deprivation and presence of haemoglobin determined *CtHMX1* induction. This result corroborates to data obtained for *CaHMX1* and *HMX1* (*S. cerevisiae*) genes, which also show induced expression under iron restriction (Santos *et al.*, 2003; Protchenko & Philpott, 2003; Pendrak *et al.*, 2004b). Unlike observed in the presence of haemoglobin and iron restriction, expression of *CtHMX1* was suppressed in the presence of erythrocytes. This is the first study evaluating the effect of erythrocytes in regulating the expression of a gene possibly related to the acquisition of iron from the haem group in *Candida* spp.

In conclusion, we report here that the phenotypic expression of the haemolytic factor in *C. tropicalis* is influenced by the presence of haemoglobin and erythrocytes. Our results indicate that *CtHMX1* is related to haem iron acquisition by *C. tropicalis*. Additionally, our results suggest that two possible steps related to iron acquisition - the production of haemolytic factor and *CtHMX1* expression - are controlled independently, considering that iron deprivation determined the lowest levels of haemolytic activity and highest levels of *CtHMX1* expression. Finally, the presence of erythrocytes was related to increased levels of haemolysis and the repression of *CtHMX1* expression. Further studies are being conducted to determine the levels of haemolytic factor produced by *C. tropicalis* in different iron sources and to clarify the role of erythrocytes in regulating the expression of genes related to haem iron acquisition in this species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Ms Martha Viviana Torres Cely for the statistical support and Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira for their help in bioinformatics analysis. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)–Brazil, Fundação Araucária/SETI/Governo do Paraná–Brazil and PROPPG/UEL-Brazil. E.J.G.F was fellowship holder of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq-Brazil.

REFERENCES

Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E. Jr., Filler, S. G. & Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesion and invasion Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *Plos Pathog* **4**, e1000217.

Almeida, R. S., Wilson, D. & Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res* **9**, 1000–1012.

Baillie, G. S. & Douglas, J. (1998). Iron-Limited Biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrob Agents Ch* **42**, 2146-2149.

Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S.; Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M. & other authors (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657-662.

Caeiro, J. P. & Rieira, F. (2014). *Candida* spesis: a new entity? *Curr Fungal Infect Rep* DOI 10.1007/s12281-013-0171-9.

Chai, L. Y. A., Denning, D. W. & Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Crit Rev Microbiol* **36**, 282-292.

Colombo, A. L., Guimarães, T., Silva, L. R. B. F., Monfardini, L. P. A., Cunha, A. K. B., Rady, P., Alves, T. & Rosas, R. C. (2007). Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Ep* **28**, 570–576.

Copping, V. M. S., Barelle, C. J., Hube, B., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P. & Odds, F. C. (2005). Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother* **55**, 645-654.

Cowartt, R. E. & Fosters, B. G. (1981). The role of iron in the production of hemolysin by *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol* **6**, 287-290.

Falagas, M. E., Roussos, N. & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida spp.* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* **14**, e954–e966.

Favero, D., França, E. J. G., Furlaneto-Maia, L., Quesada, R. M. B. & Furlaneto, M. C. (2011). Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses* **54**, e816-e 820.

Favero, D., Furlaneto-Maia, L., França, E. J. G., Góes, H. P. & Furlaneto, M. C. (2014). Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Curr Microbiol* **68**, 161-166.

Fradin, C., De Groot, P. Maccallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**, 397-415.

França, E. J. G., Furlaneto-Maia, L., Quesada, R. M. B., Favero, D., Oliveira, M. T. & Furlaneto, M. C. (2010). Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida*

parapsilosis and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* **54**, e44 – e51.

Furlaneto, M.C., Rota, J. F., Quesada, R. M. B., Furlaneto-Maia, L., Rodrigues, R. Oda, S., Oliveira, M. T., Serpa, R. & França, E. J. G. (2011). Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Tro* **44**, p. 595-599.

Hammacott J.E. (2000). *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* *fre1* mutant. *Microbiology* **146**, 869–876.

Haque, R. U. & Baldwin, J. N. (1964). Purification and properties of Staphylococcal Beta-Hemolysin. *J Bacteriol* **5**, 1304-1309.

Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G. & Ernst J.F. (2002). The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun* **70**, 5246–5255.

Hu, C.J. (2002). Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **277**, 30598–30605.

Knight, S. A. (2002). Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. *Microbiology* **148**, 29–40.

Kontoyiannis, D. P., Vaziri, I., Hanna, H. A., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Bodey, G. P. & Raad, I. I. (2001). Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis* **33**, 1676–1681.

Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G. & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* **59**, 873-880.

Lesuisse, E., Knight, S.A., Camadro, J. M. & Dancis, A. (2002). Siderophore uptake by *Candida albicans*: effect of serum treatment and comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 329–340.

Luo, G., Samaranayake, L. P. & Yau, J. Y. Y. (2001). *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* **39**, 2971-2974.

Manns, J. A.; Mosser, D. M. & Buckley, H. R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**, 5154-5156.

Mitchell, B. M.; Wu, T. G.; Jackson, B. E. & Wilhelmus, K. R. (2007). *Candida albicans* strain-dependent virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. *IOVS* **48**, 774-780

- Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S. & Harjai, K. (2008).** Iron dictates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections. *J Biomed Sci* **15**, 731-741.
- Njoku-Obi, A. N., Jenkins, E. M., Njoku-Obi, J., Adams, J. & Covington, V. (1963).** Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins. *J. Bacteriol* **86**, 1-8.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. R., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L. & other authors (2013).** Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. *PloSOne* **8**, e59373.
- Passos, X. S., Costa, C. R., Araujo, C. R., Nascimento, E. S., Souza, L. K., Fernandes, O. F., Sales, W. S. & Silva, M. R. (2007).** Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia*, **163**, 145–151.
- Paul, T. R., Smith, S. N. & Brown, R. W. (1989).** Effect of iron depletion on cell-wall antigens of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **28**, 93-100.
- Pendrak, M. L., Yan, S. S. & Roberts, D. D. (2004a).** Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* **426**, 148–156.
- Pendrak, M. L., Chao, M. P., Yan, S. S. & Roberts, D. D. (2004b).** Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to α -biliverdin. *J Biol Chem* **279**, 3426–3433.
- Protchenko, O. & Philpott, C. C. (2003).** Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 36582–36587.
- Santos, R., Buisson, N., Knight, S., Dancis, A., Camadro, J. M. & Lesuisse, E. (2003).** Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of *CaHMX1*-encoded haem oxygenase. *Microbiology* **149**, 579-588.
- Sosinska, G. J., De Groot, P. W. J., De Mattos, M. J. T., Dekker, H. L., Koster, C. G., Hellingwerf, K. J. & Klis, F. M. (2008).** Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. *Microbiology* **154**, 510–520.
- Sorgo, A. G., Brul, S., Koster, C. G., Koning, L. J. & Klis, F. M. (2013).** Iron restriction-induced adaptations in the 1 wall proteome of *Candida albicans*. *Microbiology* **159**, 1673-1682.
- Stoebner, J. A. & Payne, S. M. (1988).** Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholera*. *Infect Immun* **56**, 2891-2895.

- Sweet, S. & Douglas, L. J. (1991).** Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**, 859-865.
- Vandeputte, P., Larcher, G., Bergès, T., Renier, G., Chabasse, D. & Bouchara, J.P. (2005).** Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chem* **49**, 4608-4615.
- Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A., Nakao, N., Mikami, T., Suzuki, M. & Matsumoto, T. (1999).** Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* **145**, 689-694.
- Weissman, Z. & Kornitzer, D. (2004).** A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol Microbiol* **53**, 1209–1220.
- Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E. & Kornitzer, D. (2008).** An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **69**, 201–217.
- Yuan, X. M., Brunk, U. Y. & Olsson, A. G. (1995).** Effects of iron- and hemoglobin-loaded human monocyte–derived macrophages on oxidation and uptake of LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1345-1351.
- Zhang, X.B.; Yu, S.J.; Yu, J. X.; Gong, Y.L.; Feng, W.; Sun, F. J. (2012).** Retrospective analysis of epidemiology and prognostic factors for candidemia at a hospital in China, 2000–2009. *Jpn J Infect Dis* **65**, 510-515.

Table 1. Primers sequences employed in RT-qPCR and respective amplicon sizes

Gene	Orientation	Sequence (5' - 3')	Amplicon size	Reference
<i>CtHMX1</i>	FW	GNCNGANGCNCANNAGNC	153 pb	This study
	RV	ANCANAGCNNAGTNACNTN		
β -Actin	FW	AACCTCTTCTCAATCATCTGC	129 pb	Vandeputte <i>et al.</i> (2005)
	RV	GCTTCCAAACCTAAATCGGC		

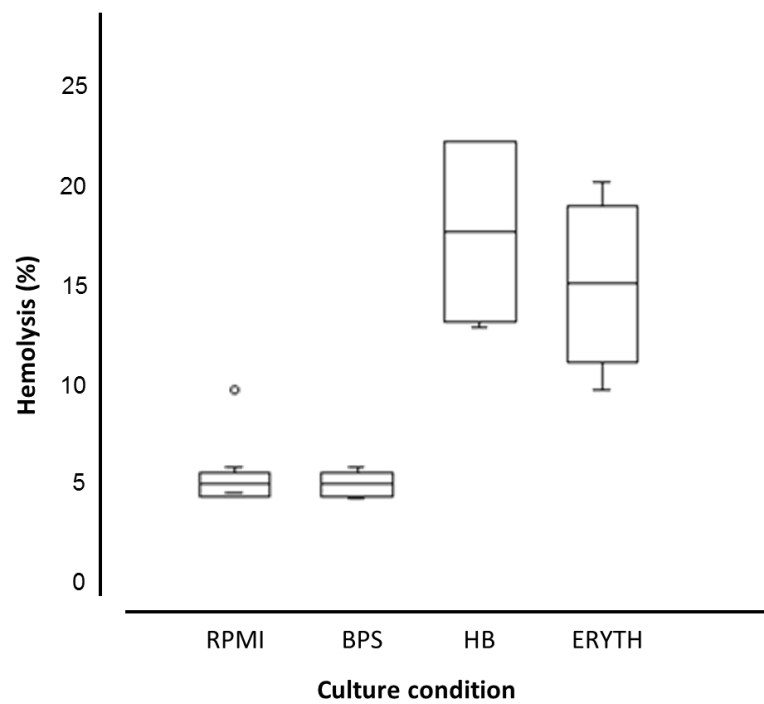
Table 2. Relative expression of the putative *CtHMX1* gene by *C. tropicalis* following grown on iron deprivation (BPS), in presence of haemoglobin or erythrocytes

Supplementation	Concentration	Expression <i>CtHMX1</i> (fold)
BPS	100	4.42 *
	50	4.36 *
Haemoglobin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	1	2.08 *
	0.125	2.58 *
Erythrocytes (%)	7%	-2.85 *
	4.50%	-1.95 *

* Significant difference ($p < 0.001$) compared to control.

Figure legend

Fig. 1 Haemolytic activity of *Candida tropicalis* clinical isolates cultured in RPMI 1640 medium alone or RPMI 1640 medium supplemented with $50\mu\text{ mol l}^{-1}$ of BPS, $1\ \mu\text{g.ml}^{-1}$ of haemoglobin (HB) or 7% of erythrocytes (ERYTH)

Figure 1

ARTIGO 2

Efeito de sangue e seus componentes na produção de fator hemolítico por *Candida tropicalis* e na expressão de *HLPt*, um possível gene que codifica o fator hemolítico dessa espécie

RESUMO

A produção de fator hemolítico tem sido reconhecida como um potencial fator de virulência em *Candida tropicalis*, no entanto o entendimento de sua expressão fenotípica e genotípica ainda é limitado. Nesse estudo foi avaliada a influencia de sangue, eritrócitos e plasma de origem humana na produção de fator hemolítico por *C. tropicalis*. Os maiores valores de hemólise foram promovidos por isolados cultivados em presença de eritrócitos, sendo que nessa condição a maioria dos isolados apresentou aumento do potencial hemolítico em comparação aos cultivos em meio RPMI 1640 sem suplementação (controle) ($p < 0,05$). Por outro lado, os cultivos suplementados com plasma foram associados aos menores valores de atividade hemolítica; em presença de 7% dessa fração do sangue todos os isolados apresentaram potencial hemolítico inferior aos cultivos controle ($p < 0,05$). Nos cultivos acrescidos de sangue a maioria dos isolados não apresentou diferenças no potencial hemolítico em comparação ao controle. A filamentação de *C. tropicalis* nas diferentes condições de cultivo também foi avaliada; em presença de eritrócitos e sangue foi verificada maior porcentagem de formas filamentosas em relação ao controle, já em presença de 3,8 ou 7% de plasma a porcentagem de hifas e pseudo-hifas presentes foi inferior à verificada na condição controle. Não foi constatada correlação entre a diferenciação em formas filamentosas e o potencial hemolítico dos isolados nas condições testadas. A expressão de *HLPt* (*Hemolysin Like Protein*), um possível gene relacionado ao potencial hemolítico dessa espécie, foi avaliada após cultivo de *C. tropicalis* em presença de plasma e sangue. A presença de plasma não promoveu alterações na síntese de transcritos de *HLPt* por *C.*

tropicalis; o mesmo foi verificado para a maioria dos isolados nos cultivos em presença de sangue. Nossos dados sugerem que componentes do plasma exerçam uma ação neutralizadora sobre o fator hemolítico de *C. tropicalis*.

Palavras chave: Candida tropicalis, hemólise, sangue, eritrócitos, plasma, HLPt.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* são os principais agentes causais de infecções fúngicas em humanos, sendo as candidemias um grave problema de saúde pública (CLARK; HAJJEH, 2002; SARDI et al., 2013; NUCCI et al., 2013). Embora *Candida albicans* ainda seja a espécie mais amplamente associada a essas infecções, a incidência de espécies de *Candida* não-*albicans* vem aumentando mundialmente (DUTTA; PALAZZI, 2011; GUINEA, 2014). Em regiões de clima tropical, como países da América Latina e Ásia, *Candida tropicalis* destaca-se como uma das principais espécies, sendo comumente relacionada a casos de candidemia em pacientes com câncer, neutropenia e em indivíduos transplantados (CHAI et al., 2010; FALAGAS et al., 2010; MUÑOZ et al., 2011).

Revisões recentes têm listado diversos atributos que contribuem para a patogenicidade de *C. tropicalis* (CHAI et al., 2010; SILVA et al., 2012; NEGRI et al., 2012). Dentre estes tem-se o fator hemolítico, um potencial fator de virulência em espécies de *Candida* que promove a lise de eritrócitos, contribuindo para sua capacidade de acessar hemoglobina e, conseqüentemente, ferro do hospedeiro (MANNNS et al., 1994; LUO et al., 2001).

No gênero *Candida*, a capacidade de produzir e secretar fator hemolítico foram primeiramente reconhecidas para *C. albicans*; em estudos iniciais foi relatado que hifas apresentam maior potencial hemolítico quando comparadas a blastoconídeos de *C. albicans*

(MANNNS et al., 1994). Posteriormente o fator hemolítico de *C. albicans* foi caracterizado como uma manoproteína de parede celular capaz de se ligar a uma proteína específica da membrana de eritrócitos, provocando sua lise (WATANABE et al., 1999). A produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* foi primeiramente descrita por Luo e colaboradores (2001) e recentemente foi sugerido que o fator hemolítico dessa espécie seja quimicamente similar ao de *C. albicans* (FAVERO et al., 2014).

As bases moleculares que regulam a expressão do fator hemolítico por espécies de *Candida* são pouco compreendidas. Em 2000 foi descrito o possível gene *HLP* (*Hemolisin Like Protein*) de *Candida glabrata*, sendo demonstrada elevada correlação entre a síntese de transcritos de *HLP* e a atividade hemolítica de isolados da espécie (LACHKE et al., 2000; LUO et al., 2004). Recentemente um gene ortólogo, denominado *HLPt* foi descrito para *C. tropicalis* e a correlação entre expressão de *HLPt* e atividade hemolítica também foi verificada para esta espécie (FAVERO, 2012).

O entendimento a respeito da produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* ainda é limitado, o que reforça a importância de estudos relativos à regulação de sua expressão fenotípica e genotípica. Neste contexto, no presente estudo foi avaliada a influência de sangue total humano e suas frações eritrócitos e plasma na hemólise promovida por *C. tropicalis*. Para investigar uma possível associação entre a diferenciação celular em formas filamentosas e o potencial hemolítico dos isolados também foi avaliada a porcentagem de formas filamentosas presentes nas diferentes condições de cultivo. Por fim foi avaliada a influência de sangue e plasma na expressão do gene *HLPt* por *C. tropicalis*, buscando uma maior compreensão dos eventos fenotípicos observados. Foi verificado que eritrócitos e plasma interferem de formas distintas no potencial hemolítico de *C. tropicalis*; já a expressão de *HLPt* não é influenciada por plasma.

METODOLOGIA

Isolados de *Candida tropicalis* e identificação

Neste estudo foram empregados isolados clínicos de *C. tropicalis* (46.10, 207.10, 236.10, 406.10 e 474.10) coletados de sangue de pacientes admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL) e mantidos no estoque de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da UEL. Os isolados foram identificados presuntivamente com emprego do meio cromogênico CHROMagar[®] *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) e a identificação foi confirmada por PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, conforme descrito por Furlaneto e colaboradores (2011).

Atividade hemolítica do sobrenadante de cultivo

A avaliação da atividade hemolítica dos isolados em presença de sangue total, eritrócitos ou plasma humanos procedeu-se conforme Favero e colaboradores (2011), com modificações. Os isolados foram pré-cultivados a partir do estoque por 18 horas em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA). As células resultantes foram coletadas, lavadas em tampão salina fosfato (PBS) e aproximadamente 10^4 células.mL⁻¹ foram inoculadas em meio RPMI 1640 sem suplementações (situação controle) ou acrescido das seguintes suplementações: 7% de sangue total humano; 7% ou 3,1% de eritrócitos humanos e 7% ou 3,8% de plasma humano (situações teste). Estas suspensões foram cultivadas por 48 horas a 37°C/180 rpm. As culturas resultantes foram centrifugadas em baixa rotação (1000g/2 min) e os sobrenadantes de cada cultivo foram cuidadosamente removidos e filtrados em membranas de celulose (Millipore MILLEX GV, Billerica, MA, USA), sendo posteriormente concentrados 10 vezes por liofilização.

Os sobrenadantes concentrados foram adicionados na proporção 1:4 (v/v) a uma suspensão de 10^8 eritrócitos humanos.mL⁻¹ em meio RPMI 1640 e o material foi incubado a

37°C por 18 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas (1000 rpm / 2 min) para sedimentação dos eritrócitos; para estimar o grau de lise dos mesmos foi determinada a absorbância do sobrenadante a 405 nm. Os percentuais de hemólise promovidos pelos isolados nas diferentes condições de cultivo foram calculados de acordo com a equação: $\text{Hemólise (\%)} = 100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_n) \times 100]$, sendo A_p , A_n e A_s as absorbâncias obtidas para controle positivo, controle negativo e amostra teste, respectivamente. Para cada condição de cultivo foram utilizados controles positivos e negativos específicos - para os controles negativos foram empregados os respectivos meios de cultivo utilizados em cada situação testada e para os controles positivos foi adicionado 0,6% de dodecil sulfato de sódio (SDS) aos respectivos meios de cultivo. Foram realizadas três repetições de cada experimento. Para os cultivos foram utilizados sangue, eritrócitos e plasma frescos, coletados de adulto saudável utilizando EDTA como anticoagulante.

Avaliação da diferenciação celular em formas filamentosas

Para essa análise foram utilizados os mesmos isolados e condições de cultivos empregados na avaliação da atividade hemolítica. Após o cultivo dos isolados por 48 horas nas situações teste e controle, uma alíquota de cada cultura foi reservada para determinação da porcentagem de diferenciação celular em formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas). Essa avaliação foi realizada por microscopia de luz avaliando-se a morfologia celular de aproximadamente 1000 células por amostra.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise por MEV o isolado 406.10 de *C. tropicalis* foi inicialmente cultivado em RPMI 1640 sem suplementações ou acrescido de 7% de sangue total, eritrócitos ou plasma humanos por 48 horas. Após o tempo de cultivo foi adicionado 0,6% de SDS aos

cultivos acrescidos de sangue e eritrócitos para lise das células sanguíneas e as culturas foram rapidamente lavadas em tampão salina fosfato (PBS). As células fúngicas de cada cultivo foram aderidas a lamínulas revestidas com poli-L-lisina; as amostras foram fixadas com solução de glutaraldeído 3,5% em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. O material foi desidratado com série alcoólica de concentração crescente, seco ao ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), recoberto com uma camada de ouro (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observado ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

Extração de RNA e transcrição reversa

Após cultivo dos isolados 46.10, 406.10 e 474.10 por 6 horas em meio RPMI 1640 (situação controle) ou RPMI 1640 suplementado com 7% de sangue total, 7% de plasma ou 3,8% de plasma humanos (situações teste), alíquotas de 1 mL de cada cultivo foram rapidamente centrifugadas e os sedimentos celulares foram submetidos a extração de RNA total utilizando o kit EZ-10 Spin Columns Total RNA Minipreps Super Kit (BIO BASIC INC, Markham, Ontario, Canada), conforme instruções do fabricante.

A transcrição reversa foi realizada partindo-se de 500 ng de RNA total previamente incubado a 64°C por 10 minutos e submetido a choque térmico em gelo por 2 minutos sendo adicionados MgCl₂ (4 mM), 2 µl de Tampão 10x, dNTP (200 µM), Oligo (dT) (0,4 µM), RNase OUT (4 U) e transcriptase reversa M-ML V (0.5 U) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em uma reação 20µL. A mistura foi incubada a 42°C por 60 minutos em termociclador Tc 3000 (Techne, Cambridge, UK).

Quantificação relativa da expressão do possível gene *HLPt*

A quantificação relativa da expressão do gene *HLPt* por *C. tropicalis* foi realizada por PCR em tempo real empregando-se o sistema LightCycler Nano (Roche, Mannheim, German). Para isso foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para o gene *HLPt* descritos por Favero (2012).

Para as reações de PCR em tempo real foi empregado o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sendo adicionados 20 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*HLPtF* e *HLPtR*), além do cDNA obtido para cada isolado em sua respectiva condição de cultivo, perfazendo uma reação de 20 µL de volume final. O gene constitutivo *ACT* (β - Actina) foi utilizado como normalizador das reações, conforme Vandeputte e colaboradores (2005). Controles negativos de reação (ausência de cDNA) foram incluídos em cada reação de PCR. Todas as reações foram submetidas ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C, por um período de 15 segundos em cada temperatura, e uma extensão adicional 72°C por 2 minutos. As eficiências das reações de amplificação para cada par de oligonucleotídeos iniciadores empregados foram estimadas por curva de calibração. Para confecção das curvas foram utilizados 5 pontos de diluição em série (1:2,5 a 1:40) de uma mistura de cDNAs de *C. tropicalis* provenientes de RNAs extraídos nas condições de estudo. A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50 °C a 98 °C em 0,5 °C a cada 2 segundos, assegurando que apenas o produto de interesse tenha sido amplificado em cada reação. Foram realizadas três repetições de cada experimento.

Análises estatísticas

Para avaliar possíveis diferenças na atividade hemolítica e filamentação dos isolados nas diferentes condições de cultivo estudadas foi empregado o teste Kruskal-Wallis,

empregando-se o *software* BioStat 5.0. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A expressão relativa do gene *HLPt* nas diferentes condições avaliadas foi determinada pelo *software* REST 2009 (*Relative Expression Software Tool*). Esse *software* avaliou possíveis diferenças entre as expressões do gene nas situações teste comparativamente à situação controle e considerou significativos valores de $p < 0,001$.

RESULTADOS

Potencial hemolítico de *C. tropicalis* em presença de sangue total, eritrócitos ou plasma humanos

Nesse estudo foi avaliada a influência de sangue, eritrócitos ou plasma humanos no potencial hemolítico de isolados clínicos de *C. tropicalis*. Inicialmente foi avaliado o potencial hemolítico dos isolados cultivados em RPMI 1640 suplementado com 7% de sangue, eritrócitos ou plasma. Cultivos em meio RPMI 1640 sem suplementações foram utilizados como controle experimental.

Considerando-se as quatro condições de cultivo avaliadas inicialmente, os maiores valores de hemólise foram constatados para os cultivos suplementados com 7% de eritrócitos (Figura 1). Nessa condição a maioria (80%) dos isolados teve aumento significativo do potencial hemolítico comparativamente aos cultivos controle ($p < 0,05$). Ainda, todos os cultivos suplementados com 7% de eritrócitos foram associados à atividade hemolítica superior aos cultivos em presença de sangue ($p < 0,05$). Por outro lado, nos cultivos em presença de sangue o potencial hemolítico da maioria dos isolados (80%) não diferiu da condição controle.

Os menores valores de hemólise foram promovidos pelos cultivos acrescidos de 7% de plasma. Nessa condição todos os isolados apresentaram potencial hemolítico significativamente inferior aos cultivos controle ($p < 0,05$); a atividade hemolítica promovida

pelos isolados cultivados em presença de 7% de plasma também foi inferior à verificada em presença de 7% de sangue ($p < 0,05$).

Considerando-se que o sangue total de adultos saudáveis é composto por 40-45% de eritrócitos e 55-60% de plasma, nesse estudo também foi avaliado o potencial hemolítico de *C. tropicalis* em presença de 3,1 e 3,8% de eritrócitos e plasma, respectivamente, que representam concentrações proporcionais às quantidades destes componentes em 7% de sangue.

Todos os cultivos suplementados com 3,1% de eritrócitos foram associados a níveis de promoção de hemólise superiores aos verificados tanto na situação controle quanto nos cultivos suplementados com sangue ($p < 0,05$). No entanto, o potencial hemolítico da maioria (80%) dos isolados cultivados em presença de 3,1% de eritrócitos não diferiu do verificado em presença de 7% dessas células sanguíneas.

A atividade hemolítica promovida por todos os sobrenadantes nos cultivos acrescidos de 3,8% de plasma não diferiu da verificada tanto nos cultivos controle quanto nos cultivos acrescidos de 7% de sangue. No entanto, o potencial hemolítico de todos os isolados cultivados nessa condição foi superior ($p < 0,05$) ao verificado nos cultivos acrescidos de 7% desse componente do sangue.

O isolado 236.10 apresentou resposta distinta dos demais com relação ao potencial hemolítico nas diferentes condições avaliadas. Este isolado não apresentou diferenças com relação à promoção de hemólise após cultivos com ou sem suplementação de 7% de eritrócitos; no entanto, nos cultivos acrescidos de 3,1% de eritrócitos o potencial hemolítico de 236.10 foi superior ao verificado em maior concentração dessas células sanguíneas ($p < 0,05$). Além disso, esse isolado apresentou redução significativa do potencial hemolítico em presença de sangue comparativamente ao controle.

Avaliação da porcentagem de formas filamentosas presentes nas diferentes condições de cultivo

A comparação entre porcentagem de formas filamentosas presente nos cultivos de *C. tropicalis* em meio RPMI 1640 sem suplementações ou suplementado com sangue (7%), eritrócitos (7 ou 3,1%) ou plasma (7 ou 3,8%) evidenciou influência da presença de sangue e seus componentes na diferenciação celular de *C. tropicalis* (Figura 1).

Os cultivos de todos os isolados nas situações teste diferiram dos cultivos na situação controle com relação à porcentagem formas filamentosas presentes ($p < 0,05$). As maiores quantidades de pseudo-hifas e hifas foram encontradas nos cultivos suplementados com 7% de eritrócitos (8% em média), seguido por 3,1% de eritrócitos e 7% de sangue, que apresentaram quantidades significativamente superiores às presentes nos cultivos controle (4,1% em média). Por outro lado, nos cultivos suplementados com as diferentes concentrações de plasma as porcentagens de formas filamentosas presentes foram inferiores às verificadas nos cultivos controle e nas demais condições avaliadas ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças entre os cultivos acrescidos de 3,1% de eritrócitos ou de 7% de sangue com relação à porcentagem de formas filamentosas presentes. A maioria dos isolados (80%) cultivados nessas duas condições também não diferiu dos cultivos acrescidos de 7% de eritrócitos. Também não foram encontradas diferenças entre a quantidade de formas filamentosas presente nos cultivos suplementados com 3,8 ou 7% de plasma.

Ultraestrutura de *C. tropicalis* em presença de sangue total, eritrócitos e plasma

A análise por MEV evidenciou diferenças nos formatos celulares de *C. tropicalis* nos cultivos em presença ou ausência de sangue e seus componentes eritrócitos e plasma

(Figura 2). Nos cultivos em presença de sangue e eritrócitos foram verificadas longas células filamentosas de *C. tropicalis*, além de blastoconídeos predominantemente ovalados; já nos cultivos acrescidos de plasma foram verificados blastoconídeos mais arredondados em comparação aos observados em RPMI 1640 e nas demais condições (Figura 2).

Nos cultivos acrescidos de sangue e seus componentes também foi verificada presença de material extracelular, ausente nos cultivos em RPMI 1640 (Figura 2 B, C e D). Nos cultivos acrescidos de sangue a quantidade de material extracelular foi notoriamente maior que a observada em presença de eritrócitos. O material extracelular encontrado em cultivos acrescidos de sangue ou plasma apresentou diferenças, ou seja, em 7% de sangue as células de *C. tropicalis* apareceram revestidas por material extracelular, enquanto a maior parte do material extracelular presente nos cultivos acrescidos de plasma não aparece recobrimdo as células e tem aspecto granular.

Expressão relativa do gene *HLPt*

Os valores de expressão relativa de *HLPt* por isolados de *C. tropicalis* cultivados em presença de 7% de sangue humano, 7 ou 3,8% de plasma humano, estão representados na Tabela 1.

Nas situações teste analisadas todos os isolados apresentaram níveis de transcritos de *HLPt* superiores aos constatados na situação controle. Os maiores níveis de transcritos foram detectados em cultivos acrescidos de 7% de sangue, sendo que essa condição determinou indução de *HLPt* em até 3,8 vezes. Nessa condição apenas o isolado 474.10 apresentou indução significativa de *HLPt* ($p < 0,001$). Este isolado apresentou os maiores níveis de transcritos em todas as condições testadas. Embora a síntese de transcritos de *HLPt* tenha sido mais elevada nos cultivos em presença de plasma que na sua ausência, nenhum

isolado apresentou diferença significativa na expressão de *HLPt* entre essas duas condições de cultivo.

DISCUSSÃO

Apesar da importância clínica de *C. tropicalis* como agente causal de infecções superficiais e sistêmicas, ainda são poucos os estudos abordando a produção de fatores de virulência por esta espécie, principalmente quando comparado à *C. albicans*. Especificamente, o conhecimento acerca da produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* ainda é bastante limitado, sendo as bases que controlam sua expressão fenotípica e genotípica pouco compreendidas.

Dentre os estudos que avaliaram a atividade hemolítica de *C. tropicalis*, a maioria realizou testes em meio solidificado suplementado com 7% de sangue de carneiro (LUO et al., 2001; FURLANETO-MAIA et al., 2008; NEGRI et al., 2010). No entanto, recentemente nosso grupo demonstrou que *C. tropicalis* é capaz de liberar fator hemolítico no sobrenadante de cultivo (FAVERO et al., 2011). No presente estudo, o emprego de uma modificação do ensaio de atividade hemolítica a partir do sobrenadante de cultivo desenvolvido por Favero e colaboradores (2011) possibilitou a avaliação da influência do sangue humano e de suas frações eritrócitos e plasma no potencial hemolítico de *C. tropicalis*.

A redução da hemólise promovida por *C. tropicalis* frente à presença de 7% de plasma, verificada neste estudo, pode indicar que uma estratégia de captação de ferro alternativa à captação de ferro do grupo heme tenha sido utilizada nesta condição. No soro de vertebrados a glicoproteína transferrina se liga com alta afinidade a íons ferro, protegendo o organismo contra a toxicidade desse elemento e, ao mesmo tempo, mantendo sua biodisponibilidade para células (BAILEY et al., 1988; CASSAT; SKAAR, 2013). Em decorrência de sua alta afinidade de ligação, a transferrina tem sido considerada indisponível

como fonte de ferro para micro-organismos. No entanto Knight e colaboradores (2005) demonstraram que *C. albicans* é capaz de captar e utilizar o ferro ligado a essa molécula. Esses autores ainda relataram que essa captação é mediada pela via reductiva, não havendo participação das estratégias de captação de ferro por sideróforos ou do grupo heme. A via de captação reductiva ainda não foi descrita para *C. tropicalis*, no entanto já foi descrito um possível gene dessa espécie que codifica uma permease férrica de membrana, similar ao gene *FTRI* de *C. albicans*, componente da via reductiva de captação de ferro dessa espécie (BUTLER et al., 2009).

Os baixos níveis de hemólise promovidos por *C. tropicalis* em presença de 7% de plasma também podem estar associados à ação neutralizadora de anticorpos ou outros componentes do plasma sobre o fator hemolítico. Recentemente nosso grupo sugeriu que o fator hemolítico de *C. tropicalis* seja uma manoproteína possivelmente componente da parede celular dessas leveduras (FAVERO, 2012; FAVERO et al., 2014), assim como demonstrado para *C. albicans* (WATANABE et al., 1999). A parede celular de *Candida* possui diversos componentes que podem estimular a resposta imune do hospedeiro e entre estes tem-se as manoproteínas, que são as moléculas mais imunogênicas da parede celular dessas leveduras. Tanto a fração carboidrato quanto a proteica das manoproteínas podem induzir uma forte resposta imune humoral, seja quando estão compondo a parede celular ou quando liberadas para o meio extracelular (MATTHEWS; BURNIE 1996; LÓPEZ-RIBOT et al., 2004). Já foi demonstrado que anticorpos anti-manoproteínas são ubíquos no soro humano, sendo sua presença possivelmente decorrente da estimulação do sistema imune ocasionada pela colonização por *Candida* (DOMER, 1989; JONES, 1990; ZHANG; KOZEL 1998).

O potencial hemolítico de *C. tropicalis* também foi influenciado pela presença de 7% de eritrócitos. A maioria dos isolados apresentou aumento do potencial hemolítico em presença dessa fração do sangue. Possíveis alterações na composição da parede celular de *C.*

tropicalis frente a presença de plasma ou eritrócitos podem ter determinado as variações de hemólise verificadas no presente estudo. Tem sido demonstrado que a composição da parede celular de *C. albicans* é alterada quando a levedura é cultivada em presença de sangue ou soro. Kruppa e colaboradores (2011) relataram aumento na quantidade total de manoproteínas na parede celular dessas leveduras em presença de sangue total ou sua fração acelular. Lowman e colaboradores (2011) observaram que a complexidade da manana da parede celular é diminuída quando *C. albicans* é cultivada nessas condições.

Apesar de os cultivos suplementados com 7% de plasma ou 7% de eritrócitos terem determinado variações no potencial hemolítico dos isolados em comparação ao controle, o mesmo não foi verificado para a maioria dos cultivos acrescidos de sangue total. Assim, nós questionamos se a hemólise promovida pelos isolados cultivados em 7% de sangue seria resultante da somatória dos efeitos das frações isoladas, eritrócitos e plasma. Buscando responder a esse questionamento a atividade hemolítica dos isolados foi também avaliada em presença de 3,1% de eritrócitos ou 3,8% de plasma, que representam quantidades proporcionais às concentrações desses constituintes em 7% de sangue. A presença de eritrócitos, mesmo na menor concentração avaliada, determinou aumento significativo do potencial hemolítico dos isolados com relação ao controle. Por outro lado, nos cultivos acrescidos de 3,8% de plasma a hemólise promovida pelos isolados não diferiu do grupo controle, indicando que o efeito do plasma na atividade hemolítica é dependente de sua concentração. Esses resultados sugerem que além do plasma e dos eritrócitos, outros componentes sanguíneos também possam interferir no potencial hemolítico de *C. tropicalis*.

Eletromicrografias de cultivos de *C. tropicalis* em presença de sangue mostram grande quantidade de material extracelular aderido às células fungicas; parte desse material extracelular pode ser proveniente da atividade de neutrófilos. Tem sido demonstrado que um dos mecanismos de atuação de neutrófilos sobre micro-organismos invasores é a formação de

armadilhas extracelulares (*Neutrophil Extracellular Traps* - NETs). Estas estruturas são compostas por cromatina e grânulos de proteína liberados dos neutrófilos e tem a capacidade de se ligar e matar micro-organismos, incluindo *Candida* spp (BRINKMANN et al., 2004; URBAN et al., 2006; FUCHS et al., 2007; BYRD et al., 2013).

A quantidade significativa de material extracelular verificada nos cultivos de *C. tropicalis* em presença de plasma e o formato arredondado das células nessa condição podem representar mecanismos de defesa da levedura contra um ambiente hostil. Em tratamento com compostos de ação antimicrobiana, *C. tropicalis* forma blastoconídeos arredondados e é verificada grande quantidade de material extracelular de aspecto granular (SERPA et al., 2012), de forma semelhante à revelada pelas eletromicrografias de cultivos em presença de plasma.

Neste estudo, a maioria dos isolados apresentou o mesmo padrão de promoção de hemólise nas condições de cultivo avaliadas, no entanto foram observadas variações interespecíficas demonstrando que a produção de fator hemolítico em diferentes micro-ambientes pode ser regulada de maneira isolado-dependente. Variações isolado-dependente na produção de outros fatores de virulência já foram verificadas para espécies de *Candida* (COPPING et al., 2005; MITCHELL et al., 2007; SPECIAN et al., 2013).

Nas condições de estudo não foi verificada correlação entre a diferenciação morfológica (blastoconídeo-formas filamentosas) e a hemólise promovida por *C. tropicalis* (Figura 1).

A presença de sangue ou de eritrócitos, nas duas concentrações avaliadas, determinou maior diferenciação em formas filamentosas em comparação ao controle, sendo o oposto observado para os cultivos nas diferentes concentrações de plasma, nos quais foram observadas as menores quantidades de hifas e pseudo-hifas. Por outro lado, a capacidade hemolítica dos isolados cultivados em presença de sangue ou 3,8% de plasma não diferiu da

verificada na condição controle. Além disso, o isolado 236.10 apresentou resposta distinta dos demais com relação ao potencial hemolítico em algumas condições de cultivo, no entanto o potencial de filamentação deste isolado não diferiu dos demais nas diferentes condições.

Fradin e colaboradores (2005) verificaram que em presença de eritrócitos e soro *C. albicans* rapidamente realiza a morfogênese blastoconídeo-hifa. Tem sido relatado que a diferenciação de células blastoconidiais de *C. albicans* a formas filamentosas está relacionada ao aumento de seu potencial de virulência (CARLISLEA et al., 2008; THOMPSON, et al., 2011). Ao contrário do verificado no presente trabalho, estudos pioneiros relativos à produção do fator hemolítico por *C. albicans* sugeriram que células hifais desses fungos estariam relacionadas a uma maior produção de fator hemolítico comparativamente a células blastoconidiais e que apenas hifas teriam habilidade de utilizar hemoglobina como fonte de ferro (MANNNS et al., 1994; TANAKA et al., 1997).

Para aprofundar nosso conhecimento sobre a regulação da produção de fator hemolítico por *C. tropicalis*, e na tentativa de esclarecer algumas das proposições deste estudo, foi avaliada a expressão do gene *HLPt*. Não foi verificada correlação entre o níveis de transcritos de *HLPt* e o potencial hemolítico de isolados de *C. tropicalis* cultivados em presença de plasma. Embora a presença de 7% de plasma tenha determinado diminuição na promoção de hemólise por *C. tropicalis*, não foram verificadas diferenças nos níveis de transcritos de *HLPt* em cultivos suplementados ou não dessa fração do sangue. Estudos conduzidos até o momento indicam que a expressão do gene *HLPt* de *C. tropicalis*, assim como a de seu ortólogo *HLP* de *C. glabrata*, esteja fortemente correlacionada com a atividade hemolítica de isolados da espécie (LUO et al., 2004; FAVERO, 2012). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo fortalecem a hipótese de que a redução da atividade hemolítica de *C. tropicalis* nos cultivos em presença de 7% de plasma tenha sido

proporcionada pela atuação de anticorpos ou outros componentes plasmáticos sobre o fator hemolítico e não por alterações na sua produção.

Os maiores níveis de transcritos de *HLPt* foram constatados nos cultivos suplementados com 7% de sangue, no entanto nessa condição apenas um dos isolados apresentou indução significativa da expressão em comparação ao controle, o que indica que *HLPt* pode ser regulado de maneira isolado-dependente. Esse resultado concorda com o relatado por Favero (2012).

Os resultados reportados nesse estudo demonstram que frações do sangue interferem no potencial hemolítico e na filamentação de *C. tropicalis*, havendo independência com relação à expressão fenotípica desses dois fatores de virulência. Nossos resultados também sugerem que a lise de eritrócitos pelo fator hemolítico possa ser atenuada pela atuação de fatores do plasma, a exemplo de anticorpos anti-fator hemolítico.

REFERÊNCIAS

- BAILEY,S.; EVANS, R. W.; GARRATT,R. C.; GORINSKY, T. B.; HASNAIN, S.; HORSBURGH,C.; JHOTI,H.; LINDLEY, P. F.; MYDIN, J.; SARRA, R.; WATSON, J. L. Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution? **Biochemistry**, v. 27, p. 5804-5812, 1988.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.
- BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A. S.; SAKTHIKUMAR, S.;MUNRO, C. A.; RHEINBAY, E.; GRABHERR, M.; FORCHE, A.; REEDY, J. L.; AGRAFIOTI, I.; ARNAUD, M. B.; BATES, M.; BROWN, A. J. P.; BRUNKE, S.; COSTANZO, M. C.; FITZPATRICK, D. A.; DE GROOT, P. W. J.; HARRIS, D.; HOYER, L. L. HUBE, B.; KLIS, F. M.; KODIRA,C.; LENNARD, N.; LOGUE, M. E.; MARTIN,R.; NEIMAN,R. A.; NIKOLAOU, E.; QUAIL, M. A.; QUINN,J.; SANTOS, M. C.; SCHMITZBERGER, F. F.; SHERLOCK, G. SHAH, P.; SILVERSTEIN, K. SKRZYPEK, M. S.; SOLL, D.; STAGGS,R.; STANSFIELD,I; STUMPF, M. P. H.; SUDBERY, P. E.; THYAGARAJAN, S.; ZENG, Q.; BERMAN, J.; BERRIMAN, M.; HEITMAN, J.; GOW, N. A. R.; LORENZ, M. C.; BIRREN, B. W.; KELLIS,M.; CUOMO, C. A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p. 657-662, 2009.

BYRD, A. S.; O'BRIEN, X. M.; JOHNSON, C. M.; LAVIGNE, L. M.; REICHNER, J. S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 4136-4148, 2013.

CARLISLEA, P. L.; BANERJEEA, M.; LAZZELLB, A.; MONTEAGUDOC, C.; LÓPEZ-RIBOTB, J. L.; KADOSHA, D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, p. 599 – 604, 2008.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 13, p. 509-519, 2013.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W. WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p.282-292, 2010.

CLARK, C. A.; HAJJEH, R. A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 569-574, 2002.

COPPING, V. M. S.; BARELLE, C. J.; HUBE, B.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C.; Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted protease genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 55, p. 645-654, 2005.

DOMER, J. E. *Candida* cell wall mannan: a polysaccharide with diverse immunologic properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v.17, p.33–51, 1989.

DUTTA, A.; PALAZZI, D. L. *Candida non-albicans* versus *Candida albicans* fungemia in the non-neonatal pediatric population. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 8, p. 664-668, 2011.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida spp.* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, e954–e966, 2010.

FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B. FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v. 54,p. e.816- e.820, 2011.

FAVERO, Daniel. Análise da produção e expressão de fator hemolítico em *Candida tropicalis*. 2012. 91 fls. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Hemolytic factor production by clinical Isolates of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 68, p. 161-166,2014.

FRADIN, C.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; SCHALLER, M.; KLIS, F.; ODDS, F. C. HUBE, B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Molecular Microbiology**, v. 56, p.397-415, 2005.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C.; HURWITZ, R.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; WEINRAUCH, Y.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 176, p. 231–241, 2007.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 66, p. 209-217, 2008.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 595-599, 2011.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, DOI: 10.1111/1469-0691.12539, 2014.

JONES, J. M. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.32–45, 1990.

KNIGHT, S. A. B.; VILAIRE, D.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5482–5492, 2005.

KRUPPA, M.; GREENE, R. R.; NOSS, I.; WLOWMAN, D.; WILLIAMS, D. L.; *C. albicans* increases cell wall mannoprotein, but not mannan, in response to blood, serum and cultivation at physiological temperature. **Glycobiology**, v. 21, p. 1173–1180, 2011

LACHKE, S.A.; SRIKANTHA T.; TSAI, L.K.; DANIELS; K. AND SOLL, D.R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene *MT-II* and the newly discovered hemolysin gene *HLP*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 884-895, 2000.

LÓPEZ-RIBOT, J.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTINEZ, J. P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology** v. 41 p. 187–196, 2004.

LOWMAN, D. W.; ENSLEY, H. E.; GREENE, R. R.; KNAGGE, K. J.; WILLIAMS, D. L.; KRUPPA, M. D. Mannan structural complexity is decreased when *Candida albicans* is cultivated in blood or serum at physiological temperature. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2752–2759, 2011.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971-2974, 2001.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; CHEUNG, B. P. K.; TANG, G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica**, v. 112, p. 283-290, 2004.

MANNS, J. A.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by

Candida albicans. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

MATTHEWS, R. C.; BURNIE, J. P. Antibodies against *Candida*: potential therapeutics? **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 354–358, 1996.

MITCHELL, B. M.; WU, T. G.; JACKSON, B. E.; WILHELMUS, K. R. *Candida albicans* strain-dependent virulence and Rim13p-Mediated filamentation in experimental keratomycosis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, p. 774-780, 2007.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1538–1545, 2011.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v.169, p.175–182, 2010

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PlosOne**, v.8, p. e59373, 2013.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T.; DINIZ, A. A. FURLANETO, M. C. *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, 1704–1708, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; DAVID W.WILLIAMS JOANA AZEREDO *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288–305, 2012.

SPECIAN, A. F. L.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural analysis of *in vitro* adherence and production of acid proteases by clinical isolates of *Candida parapsilosis* sensu stricto following growth in the presence of keratinous substrates from human source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 1-6, 2013.

TANAKA, W. T. H; N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350-353, 1997.

THOMPSON, D. L.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species **Eukaryotic Cell**, v.10, p.1173 – 1182, 2011.

URBAN, C. F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal form. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 668–676, 2006.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P.; Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4608-4615, 2005.

WATANABE, T. H.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.

ZHANG, M. X.; KOZEL, T. R. Mannan-specific immunoglobulin G Antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4845–4850, 1998.

Tabela 1- Expressão relativa do gene *HLPt* por isolados clínicos de *C. tropicalis* cultivados em presença de sangue total humano (7%) ou plasma humano (7 ou 3,8%). Os valores são representativos de três repetições experimentais.

Suplementação	Isolado	Expressão <i>HLPt</i> (vezes)
Sangue 7%	46.10	1,827
	406.10	1,306
	474.10	3,811*
Plasma 7%	46.10	1,803
	406.10	1,216
	474.10	2,759
Plasma 3,8%	46.10	1,616
	406.10	1,066
	474.10	2,765

* Diferença significativa em relação ao controle (RPMI 1640 sem suplementações)

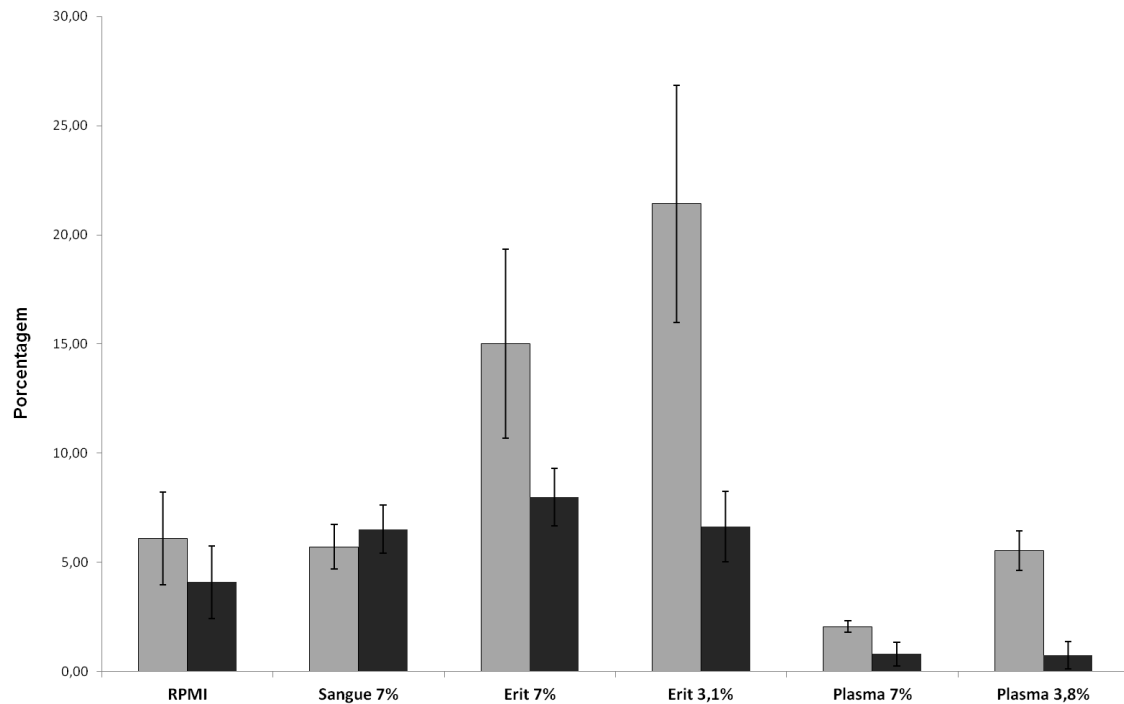


Figura 1- Atividade hemolítica (barras claras) e filamentação (barras escuras) médias dos isolados de *C. tropicalis* após cultivos por 48 horas em RPMI 1640 sem suplementações ou suplementado por 7% de sangue total, 7% ou 3,1% de eritrócitos (Erit), 7% ou 3,8% de plasma. Os valores representam médias de três repetições experimentais.

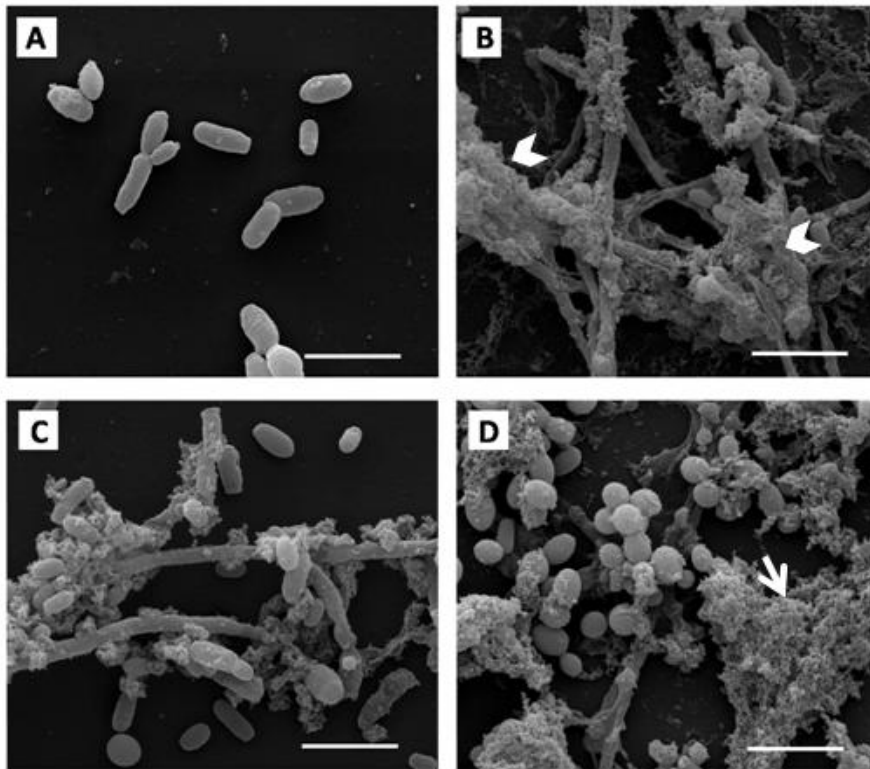


Figura 2 - Ultraestrutura do isolado 406.10 de *C. tropicalis* após cultivo por 48 horas em meio RPMI 1640 sem suplementações (A) ou suplementado por 7% de sangue total (B), 7% de eritrócitos (C) ou 7% de plasma humanos (D). Grande quantidade de matriz extracelular aderida às células é verificada nos cultivos acrescidos de sangue (cabeça de seta). Nos cultivos acrescidos de plasma observa-se matriz extracelular granular (seta). As barras representam 10 μ m.

ARTIGO 3

Avaliação do efeito de diferentes açúcares no potencial hemolítico de *Candida tropicalis*.

RESUMO

A capacidade hemolítica é reconhecida como um possível determinante de virulência de *C. tropicalis*, no entanto, os fatores relacionados à regulação da produção de fator hemolítico são pouco compreendidos. Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes açúcares (glicose, sacarose e manose) na produção de fator hemolítico por isolados clínicos de *C. tropicalis*. Cultivos em meio RPMI 1640 sem suplementação de açúcares foram utilizados como controle. As diferentes concentrações de glicose e sacarose testadas determinaram aumento significativo do potencial hemolítico de todos os isolados avaliados ($p < 0,05$). O mesmo foi verificado para cultivos acrescidos de manose nas concentrações 4 e 6%; em cultivos acrescidos de 2% desse açúcar a maioria (60%) dos isolados também apresentou potencial hemolítico mais elevado em comparação aos cultivos controle ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que o efeito da fonte de carbono na capacidade hemolítica é concentração-dependente. Os maiores valores de hemólise foram promovidos por cultivos em 6% de manose, sendo que nessa condição a maioria (80%) dos isolados apresentou potencial hemolítico superior ao verificado em 6% de glicose - segunda condição na qual foram verificados os maiores valores de hemólise. A lectina concanavalina A determinou inibição de mais de 50% da atividade hemolítica de cultivos de *C. tropicalis* em 6% de glicose ou manose, sugerindo que a hemólise verificada nessas condições seja, pelo menos parcialmente, decorrente da atuação de uma manoproteína hemolítica. Não foi verificada correlação entre o potencial hemolítico de *C. tropicalis* e a expressão de *HLPt* em presença de 6% de glicose,

sacarose ou manose. Nossos resultados indicam que diferentes açúcares podem influenciar o potencial hemolítico de *C. tropicalis*.

Palavras chave: Candida tropicalis, hemólise, glicose, manose, sacarose.

INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) são um grave problema de saúde pública, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. O gênero *Candida* tem sido um dos principais responsáveis pelas IFIs, sendo que espécies de *Candida* não-*albicans* tem emergido como importantes agentes dessas infecções (CHAMPS-BRO et al., 2011; LIU et al., 2011; MOR et al., 2011; ZAOUTIS et al., 2011). Em regiões equatoriais *Candida tropicalis* está entre as principais espécies relacionadas a episódios de candidemia e a incidência de infecções provocadas por esta espécie vem aumentando mundialmente (CHAI et al., 2010; NUCCI et al., 2013; GUINEA, 2014).

Diversas características contribuem para a capacidade de *C. tropicalis* invadir os tecidos do hospedeiro provocando infecções disseminadas. Dentre os possíveis atributos de virulência dessa espécie está a produção de fator hemolítico, que promove a lise dos eritrócitos e liberação da hemoglobina. Ainda são poucos os estudos relativos a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* e o conhecimento acerca deste possível fator de virulência é bastante limitado (NEGRI et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Manns e colaboradores (1994) sugeriram que a produção de fator hemolítico por *Candida albicans* seja regulada pela presença de glicose. O fator hemolítico de *C. albicans* é uma manoproteína da parede celular, sendo sua fração manana responsável pela ligação à proteína Banda 3 dos eritrócitos, provocando a lise dessas células vermelhas (WATANABE et al., 1999). Recentemente nosso grupo demonstrou que a glicose também apresenta um papel na regulação da produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* (FAVERO et al., 2011).

Nossos estudos também têm indicado que o fator hemolítico de *C. tropicalis* seja bioquimicamente similar ao de *C. albicans* (FAVERO, 2012; FAVERO et al., 2014).

A regulação da expressão genotípica do fator hemolítico de *Candida* é pouco compreendida. Tem sido sugerido que o possível gene *HLP* de *Candida glabrata* e seu ortólogo *HLPt* de *C. tropicalis* tenham papel na determinação do potencial hemolítico dessas espécies, sendo relatada correlação entre a síntese de transcritos dos referidos genes e a promoção de hemólise por essas espécies (LUO et al., 2004; FAVERO, 2012).

No presente estudo foi demonstrado que diferentes açúcares podem influenciar na hemólise promovida por *C. tropicalis* e que a expressão de *HLPt* não é correlacionada ao potencial hemolítico dos isolados nas condições testadas.

METODOLOGIA

Isolados de *C. tropicalis* e identificação

Os isolados de *C. tropicalis* empregados nesse estudo (46.10, 207.10, 236.10, 406.10 e 474.10) foram coletados de episódios de candidemia de pacientes admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e estão mantidos no estoque de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da UEL. Os isolados foram identificados presuntivamente com emprego do meio cromogênico CHROMagar[®] *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) e a identificação foi confirmada por PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, conforme descrito por Furlaneto e colaboradores (2011).

Atividade hemolítica

Os isolados foram pré-cultivados a partir do estoque por 18 horas em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA). As células resultantes foram coletadas,

lavadas em tampão salina fosfato (PBS) e aproximadamente 10^4 células.mL⁻¹ foram inoculadas em meio RPMI 1640 acrescido de 7% de sangue humano e suplementado com os açúcares glicose, sacarose ou manose, nas concentrações 2, 4 ou 6%. Cultivos em meio RPMI 1640 acrescido de 7% de sangue humano foram utilizados como controle experimental. Os isolados foram cultivados nas condições de estudo por 48 horas, a 37°C/180 rpm. Após, as culturas resultantes foram centrifugadas em baixa rotação (2000 rpm/7 min) e foi realizada a leitura espectrofotométrica do sobrenadante de cultivo a 405 nm para estimar o grau de lise dos eritrócitos.

Os percentuais de hemólise promovidos pelos isolados nas diferentes condições de cultivo foram calculados de acordo com a equação: Hemólise (%) = $100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_n) \times 100]$, sendo A_p , A_n e A_s as absorbâncias obtidas para controle positivo, controle negativo e amostra teste, respectivamente. . Para cada condição de cultivo foram utilizados controles positivos e negativos específicos - para os controles negativos foram empregados os respectivos meios de cultivo utilizados em cada situação testada e para os controles positivos foi adicionado 0,6% de dodecil sulfato de sódio (SDS) aos respectivos meios de cultivo. Foram realizadas três repetições de cada experimento.

Efeito da Concanavalina A (Con-A) na atividade hemolítica

O efeito da Con-A na atividade hemolítica de cultivos de *C. tropicalis* em presença de açúcares foi determinado conforme Favero e colaboradores (2014). Os isolados 46.10, 406.10 e 474.10 foram cultivados por 48 horas a 37°C/180 rpm em meio RPMI 1640 acrescido de 6% de glicose ou 6% de manose; as culturas resultantes foram filtradas em membranas de celulose (Millipore MILLEX GV, Billerica, MA, USA), e os sobrenadantes foram concentrados 10 vezes por liofilização. Os sobrenadantes obtidos foram incubados com $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de ConA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 hora a 37°C e em seguida

foram adicionados na proporção 1:4 a uma suspensão de eritrócitos humanos em meio RPMI 1640 (10^8 células/mL); o material foi incubado por 18 horas. Sobrenadantes de cultivo sem o tratamento com Con-A foram utilizados como controle. A inibição da hemólise foi calculada de acordo com a equação: Inibição da Hemólise (%) = $100 - [(Hc \times 100)/H]$; sendo Hc a porcentagem de hemólise promovida pelo sobrenadante de cultivo após incubação com Con-A e H a porcentagem de hemólise promovida pelo sobrenadante de cultivo sem tratamento com Con-A (controle). Foram realizadas três repetições desse experimento.

Extração de RNA e transcrição reversa

Após cultivo dos isolados 46.10, 406.10 e 474.10 por 24 horas em meio RPMI 1640 (situação controle) ou RPMI 1640 suplementado com 6% de glicose, sacarose ou manose (situações teste), alíquotas de 1 mL de cada cultivo foram centrifugadas e os sedimentos celulares foram submetidos a extração de RNA total utilizando o kit EZ-10 Spin Columns Total RNA Minipreps Super Kit (BIO BASIC INC, Markham, Ontario, Canada), conforme instruções do fabricante.

A transcrição reversa foi realizada partindo-se de 500 ng de RNA total previamente incubado a 64°C por 10 minutos e submetido a choque térmico em gelo por 2 minutos sendo adicionados $MgCl_2$ (4 mM), 2 μ l de Tampão 10x, dNTP (200 μ M), Oligo (dT) (0,4 μ M), RNase OUT (4 U) e transcriptase reversa M-ML V (0.5 U) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em uma reação 20 μ L. A mistura foi incubada a 42°C por 60 minutos em termociclador Tc 3000 (Techne, Cambridge, UK).

Quantificação relativa da expressão do possível gene HLPt

A quantificação relativa da expressão do gene *HLPt* por *C. tropicalis* foi realizada por PCR em tempo real empregando-se o sistema LightCycler Nano (Roche, Mannheim, German).

Para as reações de PCR em tempo real foi empregado o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sendo adicionados 20 μ M dos oligonucleotídeos iniciadores *HLPtF* e *HLPtR*, descritos por Favero (2012), além do cDNA obtido para cada isolado em sua respectiva condição de cultivo, perfazendo uma reação de 20 μ L de volume final. O gene constitutivo *ACT* (β - Actina) foi utilizado como normalizador das reações, conforme Vandeputte e colaboradores (2005). Controles negativos de reação (ausência de cDNA) foram incluídos em cada reação de PCR. Todas as reações foram submetidas ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C, por um período de 15 segundos em cada temperatura, e uma extensão adicional 72°C por 2 minutos.

As eficiências das reações de amplificação para cada par de oligonucleotídeos iniciadores empregados foram estimadas por curva de calibração. Para confecção das curvas foram utilizados 5 pontos de diluição em série (1:2,5 a 1:40) de uma mistura de cDNAs de *C. tropicalis* provenientes de RNAs extraídos nas condições de estudo. A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50 °C a 98 °C em 0,5 °C a cada 2 segundos, assegurando que apenas o produto de interesse tenha sido amplificado em cada reação. Foram realizadas três repetições de cada experimento.

Análises estatísticas

Para avaliar possíveis diferenças no potencial hemolítico dos isolados nas diferentes condições de cultivo estudadas foi empregado o teste Kruskal-Wallis, empregando-se o *software* BioStat 5.0. Foram considerados significativos valores de p menores que 0,05. A expressão relativa do gene *HLPt* nas diferentes condições avaliadas foi determinada pelo *software* REST 2009 (*Relative Expression Software Tool*). Esse *software* avaliou possíveis diferenças entre as expressões de cada gene nas situações teste comparativamente à situação controle e considerou significativos valores de $p < 0,001$.

RESULTADOS

Potencial hemolítico de *C. tropicalis* em presença de glicose, sacarose ou manose e efeito da Con-A

A porcentagem de hemólise média promovida pelos isolados nas diferentes condições de cultivo avaliadas está representada na Figura 1. Nos cultivos acrescidos de glicose ou sacarose, nas três concentrações testadas, o potencial hemolítico de todos os isolados foi superior ao verificado em meio RPMI 1640 sem suplementação de açúcares (situação controle) ($p < 0,05$).

Nos cultivos acrescidos de 2% de manose a maioria (60%) dos isolados apresentou aumento significativo do potencial hemolítico; em 4 e 6% desse açúcar todos os isolados apresentaram promoção de hemólise superior à verificada na condição controle ($p < 0,05$). O potencial hemolítico da maioria (80%) dos isolados cultivados em 2 ou 4% de glicose não diferiu do verificado nas mesmas concentrações de sacarose. No entanto, em 6% de glicose a maioria (80%) dos isolados apresentou capacidade hemolítica superior à verificada na mesma concentração de sacarose ($p < 0,05$).

Em presença de 2 e 4% de manose, a maioria dos isolados apresentou potencial hemolítico inferior ao constatado nas mesmas concentrações de glicose ou sacarose ($p < 0,05$).

Por outro lado, em 6% de manose a hemólise promovida por todos os isolados foi superior à verificada em 6% de sacarose e 80% dos isolados cultivados nessa concentração de manose também apresentaram potencial hemolítico superior ao constatado em 6% de glicose ($p < 0,05$).

Nos cultivos acrescidos de glicose ou manose o aumento da concentração de açúcar foi correlacionado com o aumento do potencial hemolítico de todos os isolados ($p < 0,05$). O mesmo foi observado para a maioria dos isolados nos cultivos acrescidos de sacarose; 60% dos isolados apresentaram aumento do potencial hemolítico conforme o acréscimo na concentração desse açúcar de 2 para 4 ou de 4 para 6% ($p < 0,05$).

Considerando-se que a lectina ConA apresenta capacidade de ligação a resíduos manosil de glicoproteínas, nós também avaliamos o efeito promovido por essa lectina na atividade hemolítica de isolados de *C. tropicalis* cultivados em presença de 6% de glicose ou 6% de manose. Após incubação dos sobrenadantes de cultivo com $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de Con-A foi verificada redução na atividade hemolítica em pelo menos 60 e 55% para os cultivos acrescidos de glicose e manose, respectivamente (Figura 2).

Expressão relativa do gene *HLPt*

Nos cultivos acrescidos de 6% de glicose, sacarose e manose todos os isolados apresentaram síntese de transcritos de *HLPt* superiores aos constatados na situação controle. Os maiores níveis de transcritos desse gene foram verificados nos cultivos acrescidos de manose, sendo que nesta condição dois dos isolados apresentaram indução significativa de *HLPt* ($p < 0,001$). Nos cultivos acrescidos de sacarose o isolado 406.10 também apresentou indução significativa desse gene ($p < 0,001$), no entanto em presença de glicose a síntese de transcritos de *HLPt* pelos isolados não diferiu do grupo controle (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Em estudo pioneiro relativo à capacidade hemolítica de *C. albicans* foi sugerido que a expressão fenotípica do fator hemolítico seja regulada pela presença de glicose (MANNNS et al., 1994). Posteriormente, esse fator hemolítico foi caracterizado como uma manoproteína da parede celular, sendo reconhecido que sua fração açúcar é responsável pela lise dos eritrócitos (WATANABE et al., 1999). Recentemente nosso grupo evidenciou que a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* também ocorre de maneira glicose-dependente (FAVERO et ., 2011).

Neste estudo foi empregado RPMI 1640, um meio limitado em glicose (concentração de 0,2%), para avaliar o efeito de açúcares no potencial hemolítico de *C. tropicalis*. Os dados revelaram que além da glicose, outras fontes de carbono podem estimular a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis*. Nossos resultados também indicam que a intensidade da hemólise promovida por essas leveduras é influenciada pela fonte de carbono suplementar. Estudos têm demonstrado que a virulência e a composição da parede celular de *C. albicans* são afetadas pela fonte de carbono disponível para a levedura (PIRES et al., 2001; ENE et al., 2012a; ENE et al., 2012b; SANTANA et al., 2013). Tem sido sugerido que o fator hemolítico de *C. tropicalis* seja uma manoproteína da parede celular, assim como o de *C. albicans* (FAVERO, 2012; FAVERO et al., 2014). Os resultados do presente estudo podem indicar que variações nas fontes de carboidrato durante o cultivo determinem diferenças na composição da parede celular de *C. tropicalis*, refletindo na quantidade de manoproteína hemolítica presente.

Nossos resultados ainda demonstraram que o efeito da fonte de carboidratos na capacidade hemolítica é concentração-dependente, sendo que o aumento gradual na concentração de açúcar (de 2% a 6%) determina aumento gradual no potencial hemolítico. O aumento dos níveis de hemólise promovidos por *Candida* em decorrência da elevação na

concentração de glicose disponível já havia sido relatado (MALCOK et al., 2010; FAVERO et al., 2011). No entanto, que seja do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo avaliando o efeito de diferentes concentrações de sacarose e manose na hemólise promovida por *Candida* spp.

Nós verificamos que os sobrenadantes dos cultivos de *C. tropicalis* crescidos de 6% de glicose ou manose tem a atividade hemolítica consideravelmente reduzida quando incubados com Con-A, o que sugere que a hemólise promovida pelos cultivos crescidos desses açúcares seja, pelo menos parcialmente, decorrente da atuação de uma manoproteína hemolítica. O efeito de Con-A na redução da atividade hemolítica de *C. tropicalis* em cultivos sem suplementação de açúcares já foi relatado (FAVERO et al., 2014).

Neste estudo nós também avaliamos o efeito de diferentes açúcares na expressão do gene *HLPt* (*Hemolysin Like Protein*), que é correlacionado à determinação da atividade hemolítica de *C. tropicalis* (FAVERO, 2012). Embora a síntese de transcritos de *HLPt* tenha sido mais elevada em presença de glicose que na sua ausência, esse açúcar não determinou indução de *HLPt* para nenhum dos isolados avaliados, contrariamente ao verificado para a atividade hemolítica. Em presença de sacarose apenas o isolado 406.10 apresentou indução de *HLPt*, sendo que os maiores valores de hemólise em cultivos crescidos de sacarose foram promovidos por este isolado (dado não mostrado). Nos cultivos crescidos de 6% de manose, situação na qual foram verificados os maiores níveis de hemólise promovidos por *C. tropicalis*, a maioria dos isolados apresentou indução de *HLPt*. Apesar de sacarose e manose terem determinado indução da síntese de transcritos de *HLPt* por alguns isolados, não foi verificada indução acentuada desse gene em nenhuma situação, ao contrário da acentuada elevação da atividade hemolítica verificada em presença desses açúcares.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que além de uma possível manoproteína hemolítica, outras moléculas hemolíticas produzidas por *C. tropicalis* possam contribuir para

seu potencial hemolítico após cultivos em presença de açúcares. Estudos têm sugerido que exista uma correlação entre a geração de álcool em consequência da fermentação de glicose por *C. tropicalis* e a atividade hemolítica dessa levedura. Foi sugerido que em presença de álcool *C. tropicalis* produza grandes quantidades de peróxido de hidrogênio, que seria um dos agentes responsáveis pela hemólise promovida por esta espécie (SHUSTER et al., 2004; 2007).

Neste estudo foi reportado pela primeira vez que diferentes açúcares podem contribuir de maneira concentração-dependente para o potencial hemolítico de *C. tropicalis*. Nas condições testadas não foi encontrada correlação entre a hemólise promovida por *C. tropicalis* e a síntese de transcritos de *HLPt*, o que pode indicar que a atividade hemolítica exibida por esta levedura em presença de açúcares seja multifatorial.

REFERÊNCIAS

- CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W. WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p.282-292, 2010.
- CHAMPS-BRO, B.; LEROY-COTTEAU, A.; MAZINGUE, F.; PASQUIER, F.; FRANÇOIS, N.; CORM, S.; LEMAITRE, L.; POULAIN, D.; YAKOUB-AGHA, I.; ALFANDARI, S.; SENDID, B. Invasive fungal infections: epidemiology and analysis of antifungal prescriptions in onco-haematology. **Journal of Clinical Pharmacy and therapeutics**, v. 36, p. 152-160, 2011.
- ENE, I. V.; ADYA, A. K.; WEHMEIER, S.; BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 1319–1335, 2012a.
- ENE, I. V.; HEILMANN, C. J.; SORGO, A. G.; WALKER, L. A.; DE KOSTER, C. G.; MUNRO, C. A.; KLIS, F. M.; BROWN, A. J. P. Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 12, p. 3164–3179, 2012b.
- FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B. FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v. 54,p. e.816- e.820, 2011.

FAVERO, Daniel. Análise da produção e expressão de fator hemolítico em *Candida tropicalis*. 2012. 91 fls. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Hemolytic factor production by clinical Isolates of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 68, p. 161-166, 2014.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 595-599, 2011.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, DOI: 10.1111/1469-0691.12539, 2014.

LIU, X.; LING, Z.; LI, L.; RUAN, B. Invasive fungal infections in liver transplantation. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. e298-e304, 2011.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; CHEUNG, B. P. K.; TANG, G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica**, v. 112, p. 283-290, 2004.

MALCOK, H. K.; AKTAS, E.; AYYILDIZ, A.; YIGIT, N.; YAZGI, H. Hemolytic Activities of the *Candida* Species in Liquid Medium. **The Eurasian Journal of Medicine**, v.41, p.95-8, 2009.

MANNS, J. A.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

MOR, M.; GILAD, G.; KORNREICH, L.; FISHER, S.; YANIV, I.; LEVY, I. Invasive fungal infections in pediatric oncology. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, p. 1092-1097, 2011.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PlosOne**, v.8, p. e59373, 2013.

PIRES, M. F. C.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; RODRIGUES, C. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes a and b) adherence *in vitro*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.163-169, 2011.

SANTANA, I. L.; GONÇALVES, L. M.; VASCONCELLOS, A. A.; SILVA, W. J.; CURY, J. A.; CURY, A. A. D. B Dietary carbohydrates modulate *Candida albicans* biofilm development on the denture surface. **PlosOne**, v. 8, p. e64645, 2013.

SHUSTER, A.; OSHEROV, N.; ROSENBERG, M. Alcohol-mediated Haemolysis in Yeast. **Yeast**, v. 21, p. 1335-1342, 2004.

SHUSTER, A.; OSHEROV, N.; LEIKIN-FRENKEL, A.; ROSENBERG, M. Alcohol-conferred hemolysis in yeast is a consequence of increased respiratory burden. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 879–886, 2007.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; DAVID W.WILLIAMS JOANA AZEREDO *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288–305, 2012.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P.; Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4608-4615, 2005.

WATANABE, T. H.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.

ZAOUTIS, T. E.; WEBBER, S.; NAFTEL, D. C.; CHRISANT, M. A.; KAUFMAN, B.; PEARCE, F. B.; SPICER, S.; DIPCHAND, A. I. Invasive fungal infections in pediatric heart transplant recipients: Incidence, risk factors, and outcomes. **Pediatric Transplantation**, v. 15, p. 465-469, 2011.

Tabela 1 - Expressão relativa do gene *HLPt* por isolados clínicos de *C. tropicalis* cultivados em presença de 6% de glicose, sacarose ou manose. Os valores são representativos de três repetições experimentais.

		Expressão (vezes)	
Suplementação	Isolado	<i>HLPt</i>	
Glicose	46.10	1,276	
	406.10	1,62	
	474.10	1,875	
Sacarose	46.10	1,372	
	406.10	1,539*	
	474.10	1,284	
Manose	46.10	1,366	
	406.10	1,915*	
	474.10	2,401*	

* Diferença significativa em relação ao controle (meio RPMI 1640 sem suplementações)

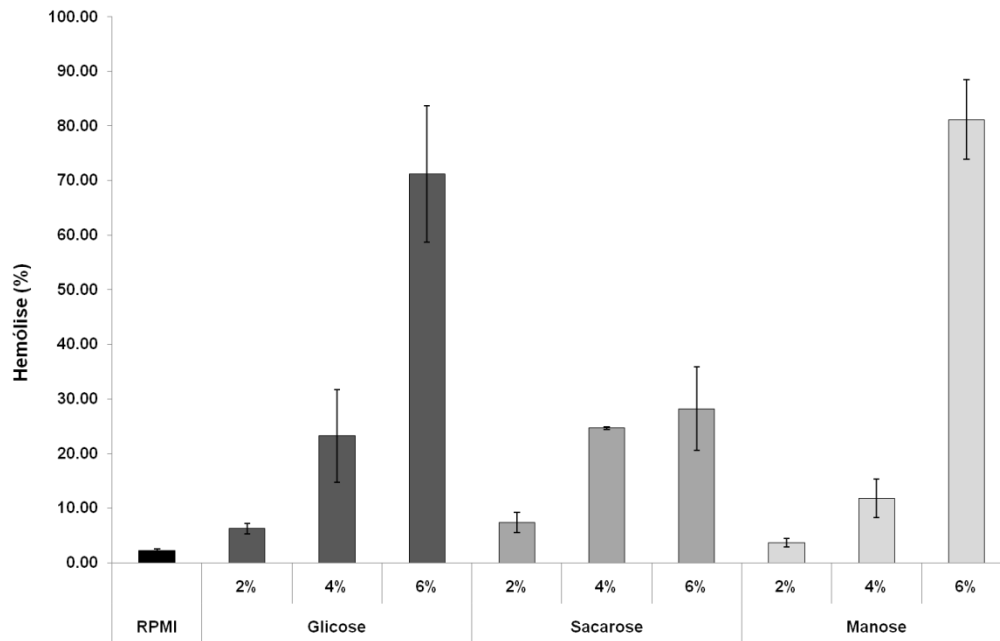


Figura 1 Atividade hemolítica (%) média de isolados de *C. tropicalis* cultivados em RPMI 1640 sem suplementação de açúcares ou acrescido de diferentes concentrações de glicose, sacarose ou manose. Os valores são representativos de três repetições experimentais.

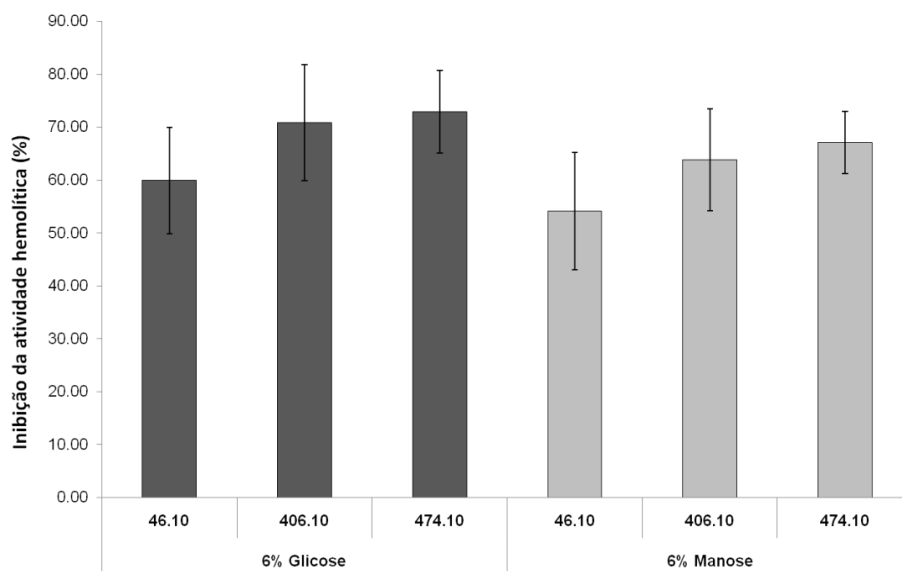


Figura 2 Efeito do tratamento com concanavalina A na atividade hemolítica promovida pelos sobrenadantes de cultivo dos isolados 46.10, 406.10 ou 474.10 em presença de 6% de glicose ou 6% de manose. Os valores representam porcentagem de inibição da atividade hemolítica

após a incubação dos sobrenadantes com a lectina e são referentes às médias de três repetições experimentais.

CONCLUSÕES

- A capacidade hemolítica de *C. tropicalis* é influenciada pelas condições ambientais;
- O gene *CtHMX1* é possivelmente relacionado com a aquisição de ferro do grupo heme por *C. tropicalis*;
- A expressão de *CtHMX1* e produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* são controladas de maneira independente;
- Não há correlação entre a filamentação e a promoção de hemólise por *C. tropicalis*;
- Diferentes açúcares influenciam na capacidade hemolítica de *C. tropicalis* de maneira concentração-dependente;
- Não há correlação entre a expressão de *HLPt* e a hemólise promovida por *C. tropicalis* em cultivo suplementado com fontes de carboidratos.