



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL FAVERO

FATOR HEMOLÍTICO EM *Candida tropicalis*

Londrina
2008

DANIEL FAVERO

FATOR HEMOLÍTICO EM *Candida tropicalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F273f Favero, Daniel.

Fator hemolítico em *Candida tropicalis* / Daniel Favero. – Londrina, 2008.

47f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Micro-biologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia – Teses. 2. *Candida tropicalis* – Teses. 3. Hemólise – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

DANIEL FAVERO

FATOR HEMOLÍTICO EM *Candida tropicalis*

BANCA EXAMINADORA

Luciano Furlaneto-Maia

Márcia Cristina Furlaneto

Terezinha Inez Estevalet Svosvidzinski

Londrina, 18 de fevereiro de 2008.

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 deste projeto foram provenientes do CNPq, CAPES, Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

Dedico:

*...À Minha mãe Vitória, por ser sempre a minha
morada forte...*

*...Aquele com quem sempre pude contar, que sempre
pude confiar, que sempre me animou e me
incentivou, quem me ensinou a acreditar em Deus...*

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento deste projeto, tive a alegria e satisfação de me aproximar um pouco mais do ilimitado mundo do conhecimento, ainda recebi o presente de conhecer pessoas novas que muito valor me agregaram com sua simpatia, inteligência e amizade, fico feliz pela oportunidade de convivência com essas pessoas maravilhosas. Também fui agraciado em ver os meus colegas de trabalho tornarem-se alguns de meus melhores amigos. Ainda, a todos aqueles que por virtude de espaço não irei citar aqui e aos mais diretamente presentes expresso meus agradecimentos como:

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, orientadora deste estudo, pela amizade, confiança e dedicação durante todo o nosso tempo de convívio, desde quando a conheci no terceiro ano de graduação, por me transmitir seus conhecimentos, experiência e ser um grande exemplo de profissional e ser humano. Acima de tudo, por ter-me recebido como um filho no laboratório e por sempre ter estado disposta a construir comigo as diretrizes de minha formação ética e profissional.

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia, por todos os ensinamentos, pelo companheirismo e prontidão a ajudar, pela amizade e pela forma contundente de mostrar que sempre é necessário saber mais. Obrigado pela sua simpatia, pelos conselhos e paciência.

Ao Professor Dr. André de Oliveira Martinez pelo bom humor, pelos muitos ensinamentos e auxílios durante minha pesquisa, por sua sempre disponibilidade, e em especial pela amizade durante todo o tempo.

A amiga e companheira de trabalho Juliana Laino pela sua prontidão em ajudar, muitas vezes parando seus próprios afazeres para me auxiliar, por todas as respostas e pela enorme atenção, além da boa companhia no dia a dia.

Ao amigo e companheiro de trabalho Marcelo Tempesta, por todas as ajudas, por dividir comigo os anseios e alegrias provenientes do dia a dia da pesquisa científica, e pela excelente companhia dentro e fora do laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia da UEL, pelos excelentes professores e pela qualidade de formação que é oferecida. Agradeço em especial ao professor Dr. Marco Antônio Nogueira, que sempre me ajudou com muita atenção, presteza, eficiência e simpatia em todos os momentos que precisei.

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária, PROPPG/UEL e FINEP pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Às professoras Dras. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e Maria Angélica E. Watanabe, por sempre me receberem em seus laboratórios com muito carinho e atenção, por suas simpatias e por estarem sempre dispostas a me escutar e a contribuir com bons conselhos, por serem estas pessoas extraordinárias, as quais além de lições de vida, me mostraram como podemos fazer as complicações da vida se transformarem em coisas simples.

Aos amigos de laboratório e dos laboratórios vizinhos: Ana Flávia, Emanuele, Henrique, Juliana Rota, Leandro, Nagomi, Viviane... ...Carla, Daniele, Francine, Patrícia, Julie, Karen, Lara, Lígia, Luiz Gustavo, Mateus e Marla. Agradeço pelas centenas de tubinhos marcados, e “passados”. Por toda a convivência em momentos de trabalho e lazer, assim como pelas reflexões científicas e filosóficas. Obrigado mais uma vez por me agüentarem... E me enriquecer com a amizade de vocês.

Às amigas Claci e Jussevania, por toda ajuda no laboratório, proporcionando melhores e fundamentais condições de trabalho.

À professora Dra. Maria Helena P. Fúngaro e novamente à Dra. Maria Angélica E. Watanabe, pela disponibilidade de equipamentos e materiais de seus laboratórios, assim como toda a amizade.

Aos amigos de turma do mestrado em Microbiologia, os quais eu nunca esquecerei.

À todas as amizades estabelecidas no período deste trabalho

À todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Vitória e Luiz, pelo amor e apoio incondicionais que sempre recebi para ir em busca de meus sonhos. E aos meus irmãos Ricardo, Cristina e Denise, por todos os incentivos e orgulhos que sempre me deram.

À Deus pela minha existência, pelo amor incondicional, pela saúde, força e capacidade que me dá todos os dias.

Aos meus eternos amigos de perto e de longe...

Obrigado por tudo!!!

“A imaginação é mais importante que o conhecimento.”

Albert Einstein

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Nenhum cientista pensa com fórmulas.”

Albert Einstein

“Nenhum homem realmente produtivo pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação.”

Albert Einstein

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida; Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre.”

Albert Einstein

“O mestre disse: Por natureza, os homens são próximos; a educação é que os afasta.”

Confúcio

“Qual seria a sua idade se você não soubesse quantos anos você tem?”

Confúcio

“Fica responsável por tudo aquilo que domesticaste.”

Antoine de Saint-Exupéry

“Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas respostas.”

Voltaire

“Só sei que nada sei.”

Sócrates

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”

Sigmund Freud

Mas o fruto do Espírito é: amor, alegria, paz, longanimidade, benignidade, bondade, fidelidade, mansidão, domínio próprio. Contra estas coisas não há lei.

(Gálatas 5:22-23)

Tudo neste mundo tem seu tempo; cada coisa tem a sua ocasião...

... Então entendi que nesta vida tudo o que a pessoa pode fazer é procurar ser feliz e viver o melhor que puder. Todos nós devemos comer e beber e aproveitar bem aquilo que ganhamos com o nosso trabalho. Isso é um presente de Deus.

(Eclesiastes ou o Sábio 3: 1, 12-13)

*“Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei(...)*

Almir Sater e Renato Teixeira

FAVERO, Daniel. **Fator hemolítico em *Candida tropicalis***. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Embora o fator hemolítico seja reconhecido como um possível fator que contribui para a patogenicidade de espécies de *Candida*, a atividade hemolítica de *Candida tropicalis* e sua expressão ainda permanecem pouco conhecidas. Neste estudo foi analisada a secreção do fator hemolítico em 16 isolados de *C. tropicalis* provenientes de diversos sítios de infecção (urina, sangue, mucosa oral, escarro, unha e mucosa vaginal). Todos os 16 isolados de *C. tropicalis* exibiram hemólise-beta (lise completa dos eritrócitos) com um halo externo de hemólise-alfa (lise parcial dos eritrócitos). A atividade do fator hemolítico no sobrenadante de cultivo de *C. tropicalis* também foi analisada. Similarmente ao encontrado no ensaio em placa, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na atividade hemolítica entre os isolados testados. Ainda, a atividade hemolítica não foi inibida pelo tratamento com o calor (100°C) ou pela adição de pepstatina A. Em nível molecular, foi identificado um possível gene que confere um fator hemolítico em *C. tropicalis* (*CtHLP*) e sua expressão foi avaliada utilizando a técnica de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR). Em experimentos preliminares, o emprego de oligonucleotídeos especificamente desenhados para o possível gene *CtHLP* e para o gene de controle constitutivo *CtACT*, nos permitiu verificar que possivelmente o fator hemolítico é diferencialmente expresso em função do tempo de incubação. A expressão do gene *CtHLP* foi máxima em 7 h de incubação em meio RPMI, onde tempos posteriores resultaram em queda na expressão. Os resultados obtidos ampliam nosso conhecimento das bases moleculares e bioquímicas da atividade hemolítica em *C. tropicalis*.

Palavras-chaves: *Candida tropicalis*. Hemólise. Possível gene *CtHLP*. Real time PCR.

FAVERO, Daniel. **Haemolytic factor in *Candida tropicalis***. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Although haemolytic factor is known to be putative virulence factor contributing to pathogenicity in *Candida* species, the haemolytic activity of *Candida tropicalis* and its expression still poor understood. In this study we analyzed the secretion of a haemolytic factor from 16 isolates of *C. tropicalis* isolated from various clinical sites of infection (urine, blood, buccal mucosa, sputum, nail and vaginal mucosa). All 16 *C. tropicalis* isolates exhibited both beta-haemolysis (complete lysis of the erythrocytes) with an outer ring of alpha-haemolysis (partial lysis of the erythrocytes). The activity of a haemolytic factor in the culture supernatant of *C. tropicalis* was also analyzed. Similarly to found in plate assays, there were no significant differences ($P>0.05$) in the haemolytic activity amongst *C. tropicalis* isolates. Furthermore, haemolytic activity was neither inhibited by heat treatment (100°C) nor by the addition of pepstatin A. At molecular level, we identify a putative *C. tropicalis* gene that confers a haemolytic factor (*CtHLP*) and its expression was evaluated using a quantitative RT-qPCR assay. In preliminary experiments, the employment of the designed specific primers for a putative *CtHLP* and an active reference control (*CtACT* gene) allowed us to verify that the putative haemolytic factor is differently expressed as function of the incubation time. The *CtHLP* was highly expressed up to 7 h incubation in RPMI medium where further incubation resulted in decreased expression. The results obtained extend our knowledge about the biochemical and molecular basis of haemolytic activity in *C. tropicalis*.

Keywords: *Candida tropicalis*. Haemolysis. Putative *CtHLP* gene. Real time PC.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fotografia representativa evidenciando a hemólise em meio agar sangue solidificado (suplementado com 3% de glicose) produzida por *C. tropicalis* após crescimento por 24 e 48 h. (a) hemólise-alfa observada após 24 h de incubação e (B) hemólise-beta observada após 48 h de incubação..... 55
- Figura 2** – Número celular e atividade hemolítica a partir de sobrenadantes de cultivo dos isolados de *C. tropicalis* após crescimento em meio RPMI por 18 h (a) e 48 h (b). Os resultados estão expressos como as médias dos cinco experimentos independentes. A atividade hemolítica está expressa na forma de porcentagem de hemólise 56
- Figura 3** – Efeito do tempo de cultivo na expressão de *CtHLP* em *C. tropicalis*. A expressão está indicada na forma de “vezes relativa à expressão do gene *CtHLP* em 1 h” Os dados foram normalizados com os níveis de expressão do gene constitutivo *CtACT*. Os experimentos foram realizados em duplicata e a figura representa a média destas..... 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 GÊNERO CANDIDA E ESPÉCIE CANDIDA TROPICALIS	14
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA	17
2.2.1 Atividade Hemolítica.....	20
2.3 RT-PCR EM TEMPO REAL	23
REFERÊNCIAS	26
Haemolytic factor in <i>Candida tropicalis</i>	37

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a importância clínica das espécies de leveduras do gênero *Candida* tem crescido significativamente, devido ao aumento na incidência de infecções oportunistas causadas por estes microrganismos. Além disso, tais infecções têm gerado elevados índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo de tratamento, assim como altas taxas de mortalidade.

Embora diversos estudos confirmem a prevalência de *Candida albicans* em isolados clínicos, têm indicado também, o aumento nas frequências de isolamento de outras espécies. Sendo que, na América Latina e em determinadas regiões européias, a espécie *Candida tropicalis* tem sido a mais freqüentemente isolada após *C. albicans*, sendo o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemias.

A detecção desta levedura, ao contrário de *C. albicans* que é um comensal normal de membranas mucosas humanas, tem sido associada mais freqüentemente com o desenvolvimento das infecções fúngicas sistêmicas.

A necessidade de estudos que caracterizem os fatores de virulência entre espécies não-albicans também tem crescido significativamente, pois a maioria dos trabalhos relativos a tais fatores utiliza *C. albicans* como modelo, sendo que nos poucos estudos que utilizam as demais espécies do gênero, têm sido detectadas diferenças significativas quanto à presença e expressão dos genes relativos aos fatores de virulência.

Os principais determinantes de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida* são: a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares (proteases e fosfolipases), a capacidade de variação da morfologia celular (capacidade de formar de hifas e pseudo-hifas, formação de biofilme e variação fenotípica), a habilidade de responder rapidamente às mudanças do meio, e a expressão de fatores de adesão. Contudo, mais recentemente, o fator hemolítico tem sido reconhecido como um possível fator de virulência nas espécies de *Candida*, e ao contrário dos demais determinantes de virulência anteriormente citados, tem sido alvo de pouquíssimos estudos, principalmente entre as espécies não-albicans como *C. tropicalis*.

Até o momento, existem poucos dados relativos a atividade hemolítica em leveduras, em contraste com trabalhos extensivos realizados em procariotos, sendo ainda que a maioria destes se baseie em *C. albicans*, havendo escassez de informações para as demais espécies de gênero.

Considerando a acentuada emergência de *C. tropicalis*, em particular em nossa região, e os poucos dados relativos a expressão de determinantes de virulência por esta espécie, o presente estudo teve como objetivos:

- analisar a secreção de fator hemolítico por isolados de *C. tropicalis* obtidos de sítios anatômicos distintos e
- caracterizar as bases moleculares relativas a produção e expressão de fator hemolítico por *C. tropicalis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *CANDIDA* E ESPÉCIE *CANDIDA TROPICALIS*

Leveduras do gênero *Candida* estão freqüentemente presente em humanos de forma comensal, sendo adaptadas a colonizar praticamente todas as regiões do corpo de indivíduos saudáveis, mas especialmente compondo a microbiota normal da pele e de membranas mucosas como a cavidade bucal e tratos gastro-intestinal e vaginal, estando assim em equilíbrio com a microbiota normal e o sistema imune do hospedeiro (WROBLEWSKA *et al.*, 2002; SCHOFIELD *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; SHINOBU *et al.*, 2007).

Contudo, determinados fatores predisponentes que levam a alterações do estado fisiológico ou imune do hospedeiro, podem favorecer a mudança do estado comensal destas leveduras para um estado de patogenia, tornando-as capazes de causar um amplo espectro de doenças, que variam desde infecções superficiais de mucosas até infecções sangüíneas disseminadas. A integridade do sistema imune do hospedeiro torna-se crucial para esta transição, com a imunidade mediada por células possuindo um papel fundamental na geração de proteção, desta forma as doenças causadas por estas leveduras afetam primariamente pacientes imunocomprometidos (HOLMES *et al.*, 1994; NAGLIK *et al.*, 1999; SCHOFIELD *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005).

Infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, seja pela emergência de doenças que causam direta ou indiretamente imunossupressão, seja pelo uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro ou por outros fatores predisponentes que desencadeiem desequilíbrios fisiológicos favoráveis à proliferação do patógeno (BANERJEE *et al.*, 1991; BECK-SAGUE *et al.*, 1993; PFALLER *et al.*, 2005; PFALLER *et al.*, 2006).

Conseqüentemente, as infecções provocadas por espécies de *Candida*, têm se tornado um problema de crescente importância clínica, gerando altos índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo do tratamento e, em níveis de infecção mais sérios, altas taxas de mortalidade, o que faz com que espécies deste gênero sejam consideradas microrganismos de grande importância clínica (WEY *et al.*, 1988; PITTET e WENZEL, 1995; DIEKEMA *et al.*, 2003; GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; PAPPAS

et al., 2003; KOJIC e DAROUICHE, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005; MORRELL *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006).

Dentre os fatores que geram o estado de predisposição ao desencadeamento de infecções oportunistas por este gênero, destacam-se aqueles que levam ao imunocomprometimento dos pacientes, como o provocado pela quimioterapia de combate ao câncer, doenças como AIDS, terapias imunossupressoras devido a transplantes de órgãos, uso de antibióticos de amplo espectro de ação, diabetes mellitus, nutrição parenteral, entre outros. A má higiene e alimentação (dieta rica em açúcares), o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, deficiência de ferro e vitaminas, o uso de contraceptivos orais, fumo e estresse, apesar de não comprometerem de forma mais grave o organismo, também são considerados importantes fatores de predisposição (HUBE *et al.*, 1997; SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; DE LEON *et al.*, 2002; DIEKEMA *et al.*, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; KOJIC *et al.*, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; ALMIRANTE *et al.*, 2006).

Assim, algumas espécies do gênero *Candida* ocorrem como patógenos oportunistas em até 95% dos pacientes com AIDS, e em 90% dos pacientes com câncer, manifestando-se principalmente através de infecções orais. Além disso, aproximadamente 75% de todas as mulheres sadias apresentam pelo menos um episódio de infecção vaginal provocada por *Candida* spp. ao longo da vida, sendo que destas, 5% a 10% sofrerão de infecções recorrentes da doença (FIDEL e SOBEL, 1996; REDDING *et al.*, 1999; LEUNG *et al.*, 2000; SAFDAR *et al.*, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; VARGAS e JOLY, 2002; DE REPENTIGNY *et al.*, 2004; RICHTER *et al.*, 2005; SHINOBU *et al.*, 2007).

Isto torna as candidemias um problema crescente em quase todas as regiões, apresentando índices e implicações relevantes no que diz respeito a custos, dificuldade de tratamento, além de principalmente mortalidade. Estas infecções estão relacionadas não somente aos fatores de predisposição anteriormente citados, mas também aos procedimentos e materiais médicos utilizados na rotina hospitalar, responsáveis por pelo menos metade dos casos nosocomiais de candidemias (DIEKEMA *et al.*, 2003; GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; KOJIC *et al.*, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; MORRELL *et al.*, 2005; BASSETTI *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006).

Segundo Vasquez e colaboradores (1993) a razão de mortalidade associada com infecções fúngicas sanguíneas causadas por *C. albicans* é de aproximadamente 70-85%, comparado com 90-100% das causadas por espécies não-albicans.

No Brasil, a incidência de candidemias varia de 147 a 198 casos por 100.000 pacientes (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). Já a incidência de candidemias em várias outras partes do mundo varia de 6 a 10 casos por 100.000 habitantes (DIEKEMA *et al.*, 2002). Estudos confirmam a prevalência de *C. albicans* em isolados clínicos, contudo, indicam também, um aumento nas freqüências de isolamento de outras espécies.

Na América Latina e em determinadas regiões européias, a espécie *Candida tropicalis* têm sido a mais freqüentemente isolada após *C. albicans*, sendo o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemias (PRICE *et al.*, 1994; PFALLER *et al.*, 2000, 2001, 2002a, 2002b, 2003, 2004; SAFDAR *et al.*, 2001; DIEKEMA *et al.*, 2002; ÁSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2002; GOLDANI e MARIO, 2003; YANG *et al.*, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 2004; BOO *et al.*, 2005; ALMIRANTE *et al.*, 2005).

No Brasil, a espécie *C. tropicalis* possui particular importância, pois é a segunda mais comumente isolada após *C. albicans* (COLOMBO *et al.*, 2006). Observou-se neste estudo que o número de casos de candidemia, para cada 1000 pacientes, é de 2 a 15 vezes maior do que os relatados pelos principais estudos epidemiológicos em outras regiões demográficas, o que torna a situação clínica deste tipo de infecção mais problemática.

C. tropicalis apresenta considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, e quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos ou danos na mucosa. E, ao contrário de *C. albicans*, a detecção de *C. tropicalis* está freqüentemente associada com o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas (ZAUGG *et al.*, 2001), embora diversos determinantes de virulência sejam compartilhados entre estas duas espécies.

Em um estudo realizado com oito espécies de *Candida* clinicamente importantes, *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais virulenta em modelos animais, sendo a maior virulência atribuída a *C. albicans*. Isto pode ser explicado, em parte, pela forte propriedade de aderência apresentada por *C. tropicalis* e *C. albicans* relativa às demais espécies patogênicas de *Candida*. Assim como outras leveduras do gênero, *C. tropicalis* é capaz de formar pseudo-hifas, e em alguns casos também pode formar hifas verdadeiras, além de “switching” fenotípico. Estas similaridades, entre outras, refletem as relações filogenéticas destas espécies, de maneira que, *C. tropicalis* forma um táxon intimamente relacionado com *C. albicans*, *Candida dubliniensis*, e *Candida parapsilosis*. (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_tropicalis/Home.html - *Candida tropicalis* Database – Broad Institute – acesso em 27/01/2008).

Embora ainda sejam escassos os estudos relativos à incidência de espécies de *Candida*, particularmente de *Candida* não-*albicans* no Brasil, estudo recente realizado pelo nosso grupo encontrou que *C. tropicalis* foi a espécie predominante em um surto no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (40% dos isolados), sendo ainda que esta espécie apresentou elevados índices de resistência aos antifúngicos comumente empregados em sua terapia (FAVERO *et al.*, 2006).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Dentre os principais fatores que influenciam a etiologia de uma doença, está o estado fisiológico do hospedeiro, sendo este inclusive, o primeiro fator que influencia as infecções causadas pelas espécies do gênero *Candida*, também contribuindo para o desencadeamento de um extenso repertório de determinantes de virulência seletivamente expressos de acordo com o tipo, estágio, sítio anatômico da infecção, com a resposta natural do organismo, assim como com os fatores de predisposição pelos quais o indivíduo está sendo afetado (STAIB *et al.*, 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; KANTARCIOGLU e YÜCEL, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004).

Os principais determinantes de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida* são: a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares (proteases e fosfolipases), a capacidade de variação da morfologia celular (capacidade de formar de hifas e pseudo-hifas, formação de biofilme e variação fenotípica), a habilidade de responder rapidamente às mudanças do meio, e a expressão de fatores de adesão como moléculas reconhecedoras de superfícies (CALDERONE e BRAUN, 1991; SOLL, 1992; CHAFFIN *et al.*, 1998; GHANNOUM, 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; SHINOBU *et al.*, 2007).

Contudo, a maioria dos estudos relacionados a caracterização de fatores de virulência em espécies do gênero *Candida*, emprega *C. albicans* como modelo. Embora, tenham sido constatadas diferenças significativas quanto a presença dos genes relacionados a esses determinantes de virulência entre as demais espécies, bem como quanto a expressão dos mesmos, a qual é dependente da interação fungo-hospedeiro, assim como da necessidade nutricional e fisiológica do fungo no curso da infecção, deixando clara a necessidade de estudos mais detalhados referentes às demais espécies (MONOD *et al.*, 1994; GILFILLAN *et*

al., 1998; FIDEL *et al.*, 1999; STAIB *et al.*, 2000; BRIELAND *et al.*, 2001; HAYNES *et al.*, 2001; ZAUGG *et al.*, 2001; KANTARCIOGLU *et al.*, 2002; FOTEDAR e AL-HEDAITHY, 2003; NAGLIK *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; DAGDEVIREN *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2005).

Mais recentemente, outro fator tem sido reconhecido como um novo e importante atributo de patogenicidade nas espécies de *Candida*, o fator hemolítico, que ao contrário dos demais determinantes de virulência anteriormente citados, tem sido alvo de poucos estudos, principalmente entre as espécies não-albicans como *C. tropicalis* (WATANABE *et al.*, 1997; LUO *et al.*, 2001).

Neste contexto, *C. tropicalis* possui papel de destaque, considerando diversos fatores como: sua acentuada emergência, a existência de poucos estudos relacionados aos seus fatores de virulência, ao fato de sua detecção estar freqüentemente associada com o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas, além da resistência intrínseca que possui aos anti-micóticos comumente empregados no controle de candidíases.

Devido aos altos índices de isolamento de *C. tropicalis* em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, e ao fato desta espécie, juntamente com *C. albicans* e *C. glabrata*, estar relacionada às maiores taxas de mortalidade, torna-se importante a caracterização de fatores de virulência, bem como o estudo da expressão diferenciada destes fatores (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006).

Dentre os principais determinantes de virulência expressos por espécies do gênero *Candida*, as enzimas hidrolíticas extracelulares desempenham um papel central, sendo fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção. Dentre estas, destacam-se as proteinases aspárticas secretadas (*secreted aspartyl proteinases* – Saps) que têm sido reconhecidas como importantes fatores de virulência.

As proteinases aspárticas típicas compreendem um grupo de enzimas (isoenzimas) que são codificadas por genes *SAPs*. Elas são inibidas por pepstatina A e diversas delas possuem uma atividade ótima em faixas de pH ácido (KURIYAMA *et al.*, 2003; SCHALLER *et al.*, 2005). O número de genes *SAP* varia entre as espécies de *Candida* (TOGNI *et al.*, 1991; DE VIRAGH *et al.*, 1993; MONOD *et al.*, 1994; GILFILLAN *et al.*, 1998; STAIB *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2001; KANTARCIOGLU *et al.*, 2002; FOTEDAR e AL-HEDAITHY, 2003; KURIYAMA *et al.*, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; DAGDEVIREN *et al.*, 2005).

A atividade proteolítica em *C. albicans* foi primeiramente descrita em 1965 (STAIB, 1965; SCHALLER *et al.*, 2005), esta capacita o patógeno a utilizar proteínas como a única fonte de nitrogênio. Para descrever estas proteinases muitos termos diferentes foram propostos, sendo que atualmente, proteinase aspártica secretada (Sap) é mais amplamente aceito, sendo o gene correspondente designado “SAP”.

Em *C. albicans* a atividade proteolítica é atribuída a uma família SAP multigênica com pelo menos 10 membros, que estão associados também a outros determinantes de virulência como fatores de adesão, formação de hifas e alteração fenotípica. Oito destas proteinases (Sap1-8) são secretadas para o espaço extracelular, enquanto 2, as Sap9 e Sap10 são proteínas GPI ancoradas à membrana (SCHALLER *et al.*, 2005).

O papel das Saps como fatores de virulência de *C. albicans* tem sido extensivamente investigado nas últimas décadas. A atividade Sap de isolados clínicos obtidos a partir de infecções de mucosa oral foi significativamente superior as de isolados de mucosa bucal de indivíduos sadios (KURIYAMA *et al.*, 2003; SCHALLER *et al.*, 2005).

As proteases Saps facilitam a aderência a muitos tipos celulares e tecidos do hospedeiro, como mucosas do trato oral e vaginal, além de atuar na invasão de órgãos profundos, e na resistência à células fagocíticas (SCHALLER *et al.*, 2005). A expressão diferencial dos genes SAP tem sido detectada sob uma variedade de condições laboratoriais, em modelos experimentais de reconstituição da pele, cavidade oral e vaginal, e *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em tecidos de mucosa bucal infectados. A presença de 10 genes SAP, sua ativação temporal durante estágios distintos da infecção, e sua regulação coordenada com outros fatores de virulência, têm contribuído para a comprovação de que membros individuais desta família gênica possuem papel fundamental na resposta adaptativa de *C. albicans* ao seu ambiente, incluindo ao hospedeiro (TAVANTI *et al.*, 2004).

A atividade proteolítica também foi encontrada *in vitro* na maioria dos isolados de outras espécies patogênicas de *Candida*, incluindo *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* (MONOD *et al.*, 1994; GILFILLAN *et al.*, 1998; TOGNI *et al.*, 1991; ZAUGG *et al.*, 2001; DE VIRAGH *et al.*, 1993; SCHALLER *et al.*, 2005). Contudo, enquanto a atividade Sap é considerada como sendo um fator de virulência para *C. albicans* e *C. tropicalis*, seu papel como um fator de virulência para *C. parapsilosis* permanece incerto (HUBE e NAGLIK, 2001; BORG e RUCHEL, 1990; SCHALLER *et al.*, 2005).

A atividade proteolítica de outras espécies de *Candida* não patogênicas é geralmente pequena, sugerindo que a virulência está correlacionada com o nível de Sap produzida (RUCHEL *et al.*, 1992; SCHALLER *et al.*, 2005).

Assim como *C. albicans*, *C. tropicalis* apresenta atividade Sap *in vitro* em meio contendo albumina bovina sérica (BSA) como única fonte de nitrogênio. Nesta espécie, uma Sap, denominada Sapt1p, foi purificada, bioquimicamente caracterizada, e cristalizada a partir de sobrenadantes de cultivo (TOGNI *et al.*, 1991; ZAUGG *et al.*, 2001).

A ocorrência de proteinases aspárticas secretadas em *C. tropicalis* também foi demonstrada na superfície celular durante a penetração de tecidos em infecções disseminadas e evadindo de macrófagos após a fagocitose da levedura (BORG e RUCHEL, 1990; ZAUGG *et al.*, 2001).

C. tropicalis também apresenta uma família multigênica SAP constituída de quatro genes SAPT (*SAPT1* - *SAPT4*) sendo que somente a proteinase Sapt1p parece ser produzida em meio contendo BSA (ZAUGG *et al.*, 2001).

2.2.1 Atividade Hemolítica

A habilidade de microrganismos patogênicos em adquirir ferro elementar é de fundamental importância para a sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecções em seus hospedeiros. Em humanos, a maioria do ferro está localizada intracelularmente, na forma de ferritina, ou como compostos contendo o grupo heme. A pequena quantidade de ferro extracelular aparece ligada a proteínas ou em proteínas de transporte, como a transferrina e lactoferrina respectivamente (MANNNS *et al.*, 1994). Assim, uma vez que este elemento não é encontrado na forma livre, muitos patógenos o adquirem indiretamente a partir de compostos que o contenham, tal como a hemoglobina. Para isto, o patógeno deve apresentar a capacidade de destruir o grupo heme capacitando-o a extrair o ferro elementar. As enzimas que medeiam esta atividade são genericamente classificadas como hemolisinas (MANNNS *et al.*, 1994; WATANABE *et al.*, 1997; LUO *et al.*, 2001, LUO *et al.*, 2004).

Alguns microrganismos patogênicos secretam fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina ou o grupo prostético heme como fontes de ferro (BELANGER *et al.*, 1995; LEWIS e DYER, 1995; WATANABE *et al.*, 1999).

Atualmente são poucos os dados relativos a atividade hemolítica em leveduras, em contraste com extensivos trabalhos descritos para bactérias, e dentre os poucos estudos a respeito, a maioria se concentra em *C. albicans*, havendo uma escassez de informações sobre o tema entre as demais espécies de gênero.

Em estudos relacionados a produção de um fator hemolítico por *C. albicans*, Manns e colaboradores (1994) descreveram que ferro derivado de ferritina, hemina e hemoglobina podem ser utilizados pela levedura. Neste contexto, a hemoglobina apresenta-se como uma importante fonte de ferro, sendo que a produção de fator hemolítico têm sido considerado como importante fator de virulência (WATANABE *et al.*, 1997; LUO *et al.*, 2001).

De particular interesse neste contexto pode-se citar o trabalho de Pendrak e colaboradores (2004) relativo ao reconhecimento e degradação de hemoglobina por *C. albicans*. Segundo os autores, esta levedura é capaz de se ligar especificamente à hemoglobina, com conseqüente produção de heme-oxigenase, que por sua vez é capaz de retirar o ferro da molécula heme. Neste estudo também foi demonstrado que a hemoglobina deve atuar na regulação de genes sabidamente expressos durante o processo de infecção, inclusive sugerindo que além da obtenção de ferro por si, a atividade hemolítica pode estar envolvida no mecanismo de mudanças fenotípicas, relacionadas à indução de um fenótipo mais virulento ou resistente às defesas do organismo.

Manns e colaboradores (1994) observaram a ocorrência de hemólise mediada pelo complemento em *C. albicans*.

Luo e colaboradores (2001) reportaram a atividade hemolítica em placa de diversas espécies do gênero *Candida*, inclusive *C. tropicalis*, embora a metodologia utilizada possua um caráter mais qualitativo do que quantitativo. Neste estudo a produção de dois tipos distintos de hemólise foi observada em agar sangue e estas foram denominadas, com propósitos descritivos como hemólises alfa e beta, para denotar a hemólise incompleta e completa respectivamente. Esta nomenclatura é análoga à terminologia empregada para as hemolisinas alfa e beta de bactérias. A hemólise completa obtida neste estudo caracterizou-se pela presença de um halo interno totalmente translúcido idêntico ao de hemólise beta produzido por *Streptococcus pyogenes*, e a hemólise incompleta por um halo externo preto esverdeado comparável ao de hemólise alfa produzido por *Streptococcus sanguis* (Luo *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por nosso grupo visando avaliar os atributos de virulência de espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos idosos saudáveis, a atividade hemolítica *in vitro* foi avaliada de maneira semelhante à realizada por Luo e colaboradores (2001) e o mesmo perfil de hemólise foi obtido para todos os isolados testados (FURLANETO-MAIA *et al.*, dados não publicados).

Lachke e colaboradores (2000) em um estudo relacionado a regulação do “switching” fenotípico em *C. glabrata*, amplificaram e clonaram uma seqüência parcial de DNA similar à de genes relacionados a hemolisinas de uma diversidade de organismos, variando em complexidade de bactérias à nematóides. Tal seqüência foi reconhecida como um possível gene que confere atividade hemolítica sendo denominado de gene *HLP* – “hemolysin-like protein”. Esta seqüência foi posteriormente utilizada por Luo e colaboradores (2004), para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção e análise da expressão do gene *HLP* em *C. glabrata* através da técnica de PCR reversa, bem como a correlação de tal expressão com a produção de hemolisinas *in vitro*, evidenciando assim um possível papel deste gene na atividade hemolítica dos isolados testados.

Watanabe e colaboradores (1997) reportaram que para *C. albicans* o fator hemolítico que causa a liberação de hemoglobinas é secretado no meio, e sugeriram diferenças na utilização destas hemoglobinas por células hifais e leveduriformes desta espécie. Como a habilidade de formar hifas também é geralmente considerada um importante fator de virulência em *C. albicans*, neste estudo os autores postularam que isso possa ser devido, dentre outros, a maior quantidade de receptores para hemoglobina presente em células hifais e a maior capacidade de utilizar a hemoglobina como fonte de ferro neste tipo celular.

Posteriormente, Watanabe e colaboradores (1999) caracterizaram o fator hemolítico produzido por *C. albicans* como uma manoproteína derivada da parede celular, onde a atividade hemolítica está associada com uma fração de aproximadamente 200kDa rica em açúcar. Estes autores demonstraram que esta manoproteína atua em uma proteína presente na membrana dos eritrócitos que catalisa a troca de anions, denominada Banda 3. Especificamente foi sugerido que a manana liga-se à proteína Banda 3 dos eritrócitos e que os resíduos de Lisina, Lys-539 ou Lys-542, da proteína Banda 3 são importantes sítios para o ligamento das mananas.

Em 2004, Shuster e colaboradores reportaram que certos álcoois podem conferir propriedades hemolíticas em *C. tropicalis* e *C. albicans*. Este mecanismo foi denominado como “microbial alcohol-conferred haemolysis” (MACH), o qual seria devido a um processo oxidativo, relacionado às etapas iniciais da oxidação alcoólica e metabolismo subsequente (produção de aldeídos). Tais resultados suportam relatos prévios que o álcool pode ter um efeito no comportamento patogênico de várias espécies de microrganismos. Neste trabalho os autores propõem que a hemólise observada em meio agar sangue enriquecido com glicose seja devida ao etanol gerado pela levedura através da fermentação do açúcar, mesmo em condições aeróbicas. Assim eles sugerem que a hemólise mediada pelo etanol seja devida

a elaboração de acetaldeído, um produto tóxico da oxidação inicial do etanol, e propõem que a hemólise conferida por alguns álcoois é mediada indiretamente pelo acúmulo deste ou de aldeídos análogos, o qual leva à desestabilização das membranas dos eritrócitos.

2.3 RT-PCR EM TEMPO REAL

Metodologias moleculares de diagnóstico e análise quantitativa da expressão de genes representam ferramentas importantes em diversos campos da pesquisa biológica. Medições da expressão gênica têm sido extensivamente utilizadas no monitoramento de respostas biológicas a vários estímulos, além de permitir o estudo da função de genes (HEID *et al.*, 1996; BUSTIN, S. A. 2000).

A PCR em tempo real (qPCR) permite o monitoramento da reação de amplificação do DNA, e dessa maneira, pode determinar valores durante a fase exponencial da reação de PCR, realizando a quantificação de DNA e RNA (RT) com elevada precisão e reprodutibilidade.

Esta técnica baseia-se na medição de aumento no sinal de fluorescência, o qual é proporcional a quantidade de DNA produzido durante cada ciclo de PCR. As reações individuais são caracterizadas pelo ciclo da PCR no qual a fluorescência se eleva sob uma fluorescência de fundo definida, um parâmetro conhecido como “*threshold cycle*” (Ct) ou “*crossing point*” (Cp). Quanto maior a quantidade de DNA alvo, menor o valor de Ct. Esta correlação entre fluorescência e quantidade de produto amplificado permite a quantificação acurada de moléculas de alvo sobre uma ampla escala, enquanto retém a sensibilidade e especificidade do convencional “ponto final” da técnica de PCR (NOLAN *et al.*, 2006).

Quatro diferentes fluoróforos estão normalmente disponíveis para a PCR em tempo real, sendo estes: TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Molecular Beacons, Scorpions® e SYBR® Green (Molecular Probes), os quais permitem a detecção dos produtos de PCR via geração de um sinal fluorescente (<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr/> - RT-PCR *the Basics* - acesso em 04/02/2008).

O SYBR® Green é um fluoróforo que exibe uma baixa fluorescência quando em solução, mas emite um forte sinal quando ligado ao DNA dupla fita. Ele liga-se de maneira específica a todo DNA dupla fita e com a excitação proveniente da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite fluorescência de coloração verde proporcional á

quantidade de DNA fita dupla contido na amostra. Durante a reação de amplificação, as moléculas de SYBR® Green ligam-se às moléculas recém sintetizadas pela DNA polimerase, dessa forma, a reação pode ser monitorada continuamente através do aumento crescente da fluorescência. A fluorescência é detectada pelo equipamento acoplado ao termociclador no momento da reação de PCR, e ao final de cada ciclo da reação de amplificação é possível avaliar a quantidade de DNA amplificado (VITZHUM *et al.*, 1999). Ao final da reação, os valores de fluorescência correspondente a cada ciclo da PCR geram uma curva de fluorescência, que está diretamente associada à quantidade de produto amplificado. O primeiro ponto que permite a quantificação exata do material amplificado baseado na fluorescência é o *Ct*, e é o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Quanto aos métodos de quantificação, existem duas diferentes formas que podem ser utilizadas, a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta baseia-se em uma curva de calibração externa ou interna. Este método de quantificação determina o número de cópias do ácido nucleico de interesse, como dito, interpolando os dados da PCR em tempo real em uma curva padrão (KENNETH e SCHMITTGEN, 2001).

A quantificação relativa baseia-se na expressão relativa de um gene alvo *versus* um gene referência, como por exemplo, um gene constitutivo. A quantificação relativa é adequada na maioria dos propósitos, quando se deseja investigar mudanças fisiológicas na expressão gênica (PFAFFL, 2001). Assim quando é necessário determinar o número absoluto de transcritos, utiliza-se a quantificação absoluta; já nas situações onde é de interesse demonstrar ou detectar mudanças relativas na expressão gênica sob determinadas condições, lança-se mão da quantificação relativa.

A técnica de transcrição reversa seguida da PCR em tempo real (RT-qPCR), uma variante da reação de PCR em tempo real convencional, revolucionou os estudos de expressão gênica, garantido inúmeras vantagens sobre outras técnicas, dentre as quais a maior sensibilidade e facilidade intrínseca tornam-se conspícuas (PFAFFL, 2001). Tal técnica possibilitou o estudo quantitativo da expressão de genes em várias áreas do conhecimento, dentre os quais, na medicina molecular, biotecnologia, microbiologia e de diagnóstico, e tem se tornado o principal método de escolha para caracterizar ou confirmar a expressão de um gene, comparar níveis de RNAm em diferentes amostras (ORLANDO *et al.*, 1998), e quantificar transcritos raros e pequenas alterações na expressão de genes (PFAFFL, 2001), ou seja, a quantificação de RNA, onde limitadas quantidades de moléculas deste ácido nucleico

estão disponíveis, sendo assim considerada como o padrão “ouro” para quantificação de RNA (NOLAN *et al.* 2006).

A transcrição reversa (RT) baseia-se na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNAm, através da transcrição reversa realizada pela enzima transcriptase reversa. Assim a RT-qPCR é uma combinação de três passos: a conversão de RNA em cDNA dependente de transcriptase reversa (RT); a amplificação do cDNA através da PCR e a detecção e quantificação dos produtos de amplificação em tempo real.

Esta técnica tem sido utilizada em diversos estudos empregando como modelo espécies do gênero *Candida*, como por exemplo, o estudo da expressão de genes da família *ALS* (genes de seqüência semelhante às aglutininas) que codificam para glicoproteínas de superfície celular em *C. albicans* (O’CONNOR *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2005), da patologia e cinética de indução de RNAm de citosinas mediadoras da defesa do hospedeiro contra infecções causadas por espécies de *Candida* (BRIELAND *et al.*, 2001), da indução de genes especificamente responsáveis pela diferenciação hifal em *C. albicans* pela hemoglobina (PENDRAK e ROBERTS, 2007), de genes relacionados à morfogênese e transição morfológica em *C. albicans* sob diferentes condições ambientais (TOYODA *et al.*, 2004), do mecanismo de resistência a azoles em isolados de *C. glabrata* (SANGUINETTI *et al.*, 2005) entre outros.

REFERÊNCIAS

AKPAN, A.; MORGAN, R.; Oral candidiasis. **Postgraduate Medicine Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829–1835, 2005.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; AND THE BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1681–1685, 2006.

ÁSMUNDSDÓTTIR, L.R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3489–3492, 2002.

BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, T.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 86S–89S, 1991.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v.21, 2006.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infection Disease**, v. 167, p. 1247–1251, 1993.

BELANGER, M., BEGIN, C. AND JACQUES, M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. **Infect Immun**, v. 63, p. 656-662. 1995.

BOO, T.W.; O'REILLY, B.; O'LEARY, J.; CRYAN, B. Candidemia in an Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. **Mycoses**, v. 48, p.251-259, 2005.

BORG, M.; RUCHEL, R. Demonstration of Fungal Proteinase During Phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J Med Vet Mycol**, v, 28, p. 3-14, 1990.

BRIELAND, J.; ESSIG, D.; JACKSON, C.; FRANK, D.; LOEBENBERG, D.; MENZEL, F.; ARNOLD, B.; DIDOMENICO, B.; HARE, R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5046–5055, 2001.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155-166, 2004.

CALDERONE, R.A.; BRAUN, P.C. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 1-20, 1991.

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.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 5:22, 2005.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the Brazilian Network Candidemia Study. 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. e GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36 p.599-607, 2003.

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.

DE LEON, E.M.; JACOBBER, S.J.; SOBEL, J.D.; FOXMAN, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 1-5, 2002.

DE REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 729–759, 2004.

DE VIRAGH, P.A.; SANGLARD, D.; TOGNI, G.; FALCHETTO, R.; MONOD, M. Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 335–342, 1993.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1298–1302, 2002.

DIEKEMA, D. J.; BEEKMANN, S. E.; CHAPIN, K. C.; MOREL, K. A.; MUNSON, E.; DOERN, G. V. Epidemiology and Outcome of Nosocomial and Community-Onset Bloodstream Infection. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3655–3660, 2003.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; KESADA, T.; FURLANETO, M.C. Identificação Molecular, Determinação de Suscetibilidade e Genotipagem de *Candida* spp. Isoladas de Pacientes do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná. **Monografia (Bacharelado) – Universidade Estadual de Londrina**, Paraná, 49f. 2006.

FIDEL, JR, P.L.; SOBEL, J.D. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 335–348, 1996.

FIDEL JR, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 80–96, 1999.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of Phospholipase and Proteinase Activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensiensis*. **Mycoses**, v. 48, p. 62-67, 2003.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122–143, 2000.

GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A.R. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v. 144, p. 829–838, 1998.

GOLDANI, L.Z.; MARIO, P.S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **Journal of Infection**, v.46, p. 150-160, 2003.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; BERG, J. V.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1172-1177, 2003.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; AND WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519–1527, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p. 591-596, 2001.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J. AND WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HOLMES, A.R., CANNON, R.D., SHEPHERD, M.G.; JENKINSON, H.F. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.1, p.228-231, 1994.

HUBE, B.; SANGIARD, D.; ODDS, F.C.; HESS, D.; MONOD, M.; SCHÄFER, W.; BROWN, A.J.P.; AND GOW, N.A.R. Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* Attenuates Virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3529-3538, 1997.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.

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.

KENNETH, J.L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Applied Biosystems**, v. 25, p. 402-408, 2001.

KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255–267, 2004.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; MAO, L. *In vitro* Secreted Aspartyl Proteinase Activity of *Candida albicans* Isolated from Oral Diseases and Healthy Oral Cavities. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, p. 405-407, 2003.

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*. **Infect Immun**, v. 68, p. 884-895, 2000.

LEUNG, W.K.; DASSANAYAKE, R.S.; YAU, J.Y.Y.; JIN, L.J.; YAM, W.C.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral Colonization, Phenotypic, and Genotypic Profiles of *Candida* Species in Irradiated, Dentate, Xerostomic Nasopharyngeal Carcinoma Survivors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2219–2226, 2000.

LEWIS, L.A. e DYER, D.W. Identification of an Iron-regulated Outer Membrane Protein of *Neisseria meningitides* Involved in the Utilization of Hemoglobin Complexed to Haptoglobin. **J Bacteriol**, v.177, p. 1299-1306, 1995.

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. **APMIS**, v. 112, p. 283-290, 2004.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.8, p. 2971-2974, 2001.

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

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care Hospitals: secular trends 1991–2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 311-320, 2004.

MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; AND SANGLARD, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357–368, 1994.

MORRELL, M., FRASER, V. J., AND 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.

NAGLIK, R.J.; NEWPORT, G.; WHITE, T.C.; FERNANDES-NAGLIK, L.L.; GREENSPAN, J.S.; GREENSPAN, D.; SWEET, S.P.; CHALLACOMBE, S.J.; AND AGABIAN, N. In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2482-2490, 1999.

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.

NOLAN, T.; HANDS, R.E. AND BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA Using Real-Time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1559-1582, 2006.

NOVAIS, C.B.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

O'CONNOR, L.; LAHIFF, S.; CASEY, F.; GLENNON, M.; CORMICAN, M.; MAHER, M. Quantification of ALS1 Gene Expression in *Candida albicans* Biofilms by RT-PCR Using Hybridization Probes on the LightCycler™. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 153-162, 2005.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in Quantitative PCR. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**, v. 36, p. 255-269, 1998.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; FOR THE NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 634-643, 2003.

PENDRAK, M.L.; CHAO, M.P.; YAN, S.S. AND ROBERTS, D.D. Heme Oxygenase in *Candida albicans* Is Regulated by Hemoglobin and Is Necessary for Metabolism of Exogenous Heme and Hemoglobin to α -Biliverdin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 3426-3433, 2004.

PENDRAK, M.L.; YAN, S.S. AND ROBERTS, D.D. Hemoglobin Regulates Expression of an Activator of Mating-Type Locus α Genes in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 764-775, 2004.

PENDRAK, M.L.; ROBERTS, D.D. Hemoglobin is an Effective Inducer of Hyphal Differentiation in *Candida glabrata*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 61-71, 2007.

PFALLER, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification Real-Time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R.J. The SENTRY Participant Group. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.3, p. 747-751, 2000.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, DJ., JONES, RN., SADER, HS., FLUIT, AC., HOLLIS, RJ., MESSER, SA AND SENTRY PARTICIPANT GROUP. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.3254-3259, 2001.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.3551-3557, 2002a.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N. MESSER, S.A., HOLLIS, R.J. AND THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP. Trends in Antifungal Susceptibility of *Candida* spp. Isolated from Pediatric and Adult Patients with Bloodstream Infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.852–856, 2002b.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2176–2179, 2003.

PFALLER, M. A., S. A. MESSER, L. BOYKEN, S. TENDOLKAR, R. J. HOLLIS, AND D. J. DIEKEMA. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.** v.42, p.3142–3146, 2004.

PFALLER, M. A. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (5), p. 2155–2162, 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5848–5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 760–763, 2006.

PITTET, D.; AND WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 1177–1184, 1995.

PRICE, M.F.; LAROCCO, M.T.; GENTRY, L.O. Fluconazole Susceptibilities of *Candida* Species and Distribution of Species Recovered from Blood Cultures over a 5-Year Period. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.38, n.6, p.1422-1424 us Diseases, v.29, p.1164–1170, 1994.

REDDING, S.W.; ZELLARS, R.C.; KIRKPATRICK, W.R.; MCATEE, R.K.; CACERES, M.A.; FOTHERGILL, A.W.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; BAILEY, C.W.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3896–3900, 1999.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (5), p. 2155–2162, 2005.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; CROSS, E.W.; PARK, S.; BERNARD, E.M.; ARMSTRONG, D.; PERLIN, D.S. Prospective Study of *Candida* Species in Patients at a Comprehensive Cancer Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2129–2133, 2001.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental Oral Candidiasis in Animal Models. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 398–429, 2001.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B, RANNO, S.; TORELLI, R. AND FADDA G. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected During a Hospital Survey of Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p. 668-679, 2005.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; AND HUBE, B. Hydrolytic Enzymes as Virulence Factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.

SCHOFIELD, D.A.; WESTWATER, C.; PAULLING, E.E.; NICHOLAS, P.J.; BALISH, E. Detection of *Candida albicans* mRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded, mouse tissues by nested reverse transcription-pcr. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.831-834, 2003.

SHINOBU, C.S.; OGATTA, S.F.Y.; BIZERRA, F.; FURLANETO, L.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Lack of Association Between Genotypes and Virulence Factors in *C. albicans* Strains Isolated From Vaginal Secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 467-471, 2007.

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

SOLL, D.R. High-Frequency Switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 183-203, 1992.

STAIB, F. Serum-Proteins as Nitrogen Source for Yeast-like Fungi. **Sabouraudia**, v. 4, p. 187-193, 1965.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **PNAS**, v. 97, p. 6102–6107, 2000.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP1-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726–4734, 2004.

TAYLOR, B. N.; STAIB, P.; BINDER, A.; BIESEMEIER, A.; SEHNAL, M.; RÖLLINGHOFF, M.; MORSCHHÄUSER, J.; SCHRÖPPEL, K. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during Vaginal Infection. **Infection And Immunity**, v. 73, p. 1828–1835, 2005.

TOGNI, G.; SANGLARD, D.; FALCHETTO, R. AND MONOD, M. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. **FEBS Letters**, v. 286, p. 181–185, 1991.

TOYODA, M.; CHO, T.; KAMANISHI, H.; SUDOH, M.; CHIBANA, H. Transcriptional Profiling of the Early Stages of Germination in *Candida albicans* by Real-Time RT-PCR. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 287-296, 2004.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage Frequency, Intensity of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 341–350, 2002.

VASQUEZ, J.A.; BECKLEY, A.; DONABEDIAN, S.; SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.J. Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 2021-2030, 1993.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A Quantitative Fluorescence-based Microplate Assay for the Determination of Double-stranded DNA Using SYBR Green I and a Standard Ultraviolet Transilluminator Gel Imaging System. **Analytical Biochemistry**, v. 1, p. 59-64, 1999.

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.

WATANABE, T.H.; TANAKA, N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T. AND 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.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F. AND WENZEL, R. P. Hospital acquired candidemia: attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, p. 2642–2645, 1988.

WROBLEWSKA, M.M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSZ, A.; KRAWCZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZAK, M. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to triazoles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p.472–475, 2002.

YANG, CW., BARKHAM, TMS., CHAN FY., WANG, Y. Prevalence of *Candida* Species, Including *Candida dubliniensis*, in Singapore. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p. 472–474, 2003.

ZAUGG, C.; ZEPÉLIN, 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.

ZHAO, X.; OH, S.H.; YEATER, K.M. AND HOYER, L.L. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p Adhesins Suggests the Potential for Compensatory Function Within the Als Family. **Microbiology**, v. 151, p. 1619-1630, 2005.

<<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtPCR/>> - *RT-PCR the Basics* - acesso em 04/02/2008.

<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_tropicalis/Home.html> - *Candida tropicalis Database – Broad Institute* – acesso em 27/01/2008.

Haemolytic factor in *Candida tropicalis*

Daniel Favero¹, Luciana Furlaneto-Maia², Regina Mariuza Borsato Quesada³, André Luiz Martinez de Oliveira⁴, & Marcia Cristina Furlaneto¹

¹ Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil.

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina-PR, Brazil.

³ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil.

⁴ Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil.

Correspondence: Marcia Cristina Furlaneto, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, Londrina -PR, 86051-990, Brazil Tel.: +55-43-33715736; Fax: +55-43-33714207; E-mail furlaneto@uel.br

Abstract

Although haemolytic factor is known to be putative virulence factor contributing to pathogenicity in *Candida* species, the haemolytic activity of *Candida tropicalis* and its expression still poor understood. In this study we analyzed the secretion of a haemolytic factor from 16 isolates of *C. tropicalis* isolated from various clinical sites of infection (urine, blood, buccal mucosa, sputum, nail and vaginal mucosa). All 16 *C. tropicalis* isolates exhibited both beta-haemolysis (complete lysis of the erythrocytes) with an outer ring of alpha-haemolysis (partial lysis of the erythrocytes). The activity of a haemolytic factor in the culture supernatant of *C. tropicalis* was also analyzed. Similarly to found in plate assays, there were no significant differences ($P>0.05$) in the haemolytic activity amongst *C. tropicalis* isolates in neither of the incubation periods tested. Furthermore, haemolytic activity was neither inhibited by heat treatment (100°C) nor by the addition of pepstatin A. At molecular level, we identify a putative *C. tropicalis* haemolysin gene (*CtHLP*) and its expression was evaluated using a quantitative RT-PCR assay. In preliminary experiments, the employment of the designed specific primers for a putative *CtHLP* and an active reference control (*CtACT* gene) allowed us to verify that the putative haemolytic factor is differently expressed as function of the incubation time. The *CtHLP* was highly expressed after 7 h incubation in RPMI medium where further incubation resulted in decreased expression. The results obtained extend our knowledge about the biochemical and molecular basis of haemolytic activity in *C. tropicalis*.

Keywords *Candida tropicalis*, haemolysis, putative *CtHLP* gene, Real time PCR

Running title: Haemolytic factor in *Candida tropicalis*

Introduction

Several yeast species are among the agents causing opportunistic infections in humans and mammals. Candidiases are of the greatest clinical importance among them. In recent surveys, *Candida tropicalis* has been one of most commonly isolated non-albicans *Candida* species (Yang et al., 2006; Comert et al., 2007; Marol & Yücesoy, 2008).

Concerning invasive candidiasis, in Latin America, *C. tropicalis* accounted for 25% of the cases (Colombo et al., 2003b). Furthermore *C. tropicalis* accounts for 20 to 45% of all *Candida* isolates from blood cultures (reviewed in Krcmery & Barnes, 2002). In Brazil, *C. tropicalis* is one of the three most frequent agent of candidemia (Colombo et al., 2003a; Antunes et al., 2004; Aquino et al., 2005; Ruiz et al., 2005; Colombo et al., 2006; Medrano et al., 2006).

Multiple characteristics of *Candida* species have been proposed to be virulence factors that enable the organism to cause disseminated infections in susceptible hosts. The ability to secrete proteinases is prime candidate virulence factors (Haynes 2001). Clinical isolates of *C. tropicalis* have been shown to produce aspartic proteinases (Saps) (Zaugg et al., 2001; Kantarcioglu & Yücel, 2002; Dostal et al., 2003).

Haemolysins are known to be putative virulence factors contributing to candidal pathogenesis (Odds 1988). *C. albicans* secretes a haemolytic factor that causes the release of hemoglobin, which is then used as an iron source by the organism (Manns et al., 1994; Watanabe et al., 1997). Luo et al. (2001) reported that many *Candida* species exhibit varying ability to produce up to two types (i.e. α or β) of haemolysins following growth on blood agar enriched with glucose. Furthermore, Shuster et al. (2004) described that the addition of ethanol vapour conferred haemolytic properties on *C. tropicalis*. This feature was not observed for *C. albicans* isolates.

At biochemical level, haemolytic factor from *C. albicans* has been characterized as a mannoprotein secreted by the cells which structure of the sugar moiety was identified as a cell-wall mannan (Watanabe et al., 1999). According to these authors, the mannoprotein released from *C. albicans* binds to a specific protein on red blood cells promoting their disruption.

Apart from the phenotypic features of haemolytic factor in *Candida*, there still few data on the molecular basis of the haemolytic activity of *Candida* species. Lachke et al. (2000) have described a putative haemolysin gene in *C. glabrata* termed *HLP* (haemolysin-like protein) gene which is regulated by phenotypic switching. More recently, Luo et al. (2004) described the evidence for a role of *C. glabrata HLP* in haemolysis.

In this study, we analyzed for the first time the activity of a haemolytic factor in the culture supernatant of clinical isolates of *C. tropicalis* and the expression of a putative *C. tropicalis* haemolytic factor (*CtHLP*) gene using a quantitative RT-PCR assay, extending our knowledge about production and expression of haemolytic factor by this species.

Materials and methods

***Candida tropicalis* isolates**

A total of 16 isolates of *Candida tropicalis* isolated from various clinical sites of infection were included in the study. Six of them were isolated from urine (1-6) and three of them were isolated from blood (7-9) of hospitalized patients at the Regional University Hospital of the North of Paraná – Paraná, Brazil. The remaining isolates were obtained from buccal mucosa (10-12), sputum (13, 14), nail (15) and vaginal mucosa (16) (Furlaneto-Maia et al., 2007). The isolates obtained were presumptively identified onto CHROMagar *Candida* agar (CA; CHROMagar, France) according to manufacture's. Identification was confirmed by PCR using species-specific primers (Li et al., 2003).

Preparation of red blood cells (RBCs)

Human RBCs (A type) were centrifuged at 1080g for 7 min. The supernatant and buffy coat were removed, and the packed RBCs were further suspended in Ca²⁺- and Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS-) and washed twice with the same PBS-buffer by centrifugation. The RBCs were then added to liquid RPMI 1640 medium without phenol red and used for determination of haemolytic activity in the *C. tropicalis* culture supernatant.

Haemolytic activity - plate assay

Haemolytic factor production was evaluated using a plate assay described by Luo et al. (2001) with modifications. Isolates were precultured in Sabouraud dextrose liquid medium and grown in submerged culture (180 rpm) at 37°C for 18 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile PBS- buffer and a yeast suspension with an inoculum size of 10⁸ cells/ml was prepared using haemocytometric counts. A 10 µl amount of this suspension was spot-inoculated on a sugar-enriched, sheep blood agar medium which was

prepared by adding 7 ml of fresh sheep blood suspended in sterile PBS- to 100 ml of Sabouraud dextrose agar supplemented with 3% glucose (w/v). The plates were incubated at 37°C for 48 h. The presence of a translucent ring and/or a greenish-grey halo circumscribing the colony site, viewed with transmitted light, indicated a positive haemolytic activity. The intensity of the haemolytic factor production was estimated as arbitrary units by quantifying the diameter of the zone of the halo plus colony relative to the colony size. The experiment was repeated three times, and the results represent mean values \pm SD.

The effect of glucose on haemolytic activity was analyzed as well as incubation in either presence or absence of 5% CO₂.

Additional experiments were performed to determine the effect of addition of pepstatin A (aspartyl-protease inhibitor) at final concentration of 15 μ M on the haemolytic activity.

Haemolytic activity from culture supernatant

Haemolytic activity in the culture supernatant was analyzed by preculturing the *C. tropicalis* isolates in Sabouraud dextrose liquid medium at 37°C for 18 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile PBS- buffer and a yeast suspension with an inoculum size of 10⁴ cells was inoculated in liquid RPMI 1640 medium and incubated at 37°C for 18 and 48 h at 180 rpm. Following growth, cells were harvested by centrifugation at 1080 g for 15 min. The supernatants obtained were freeze-dried and concentrated 2.5-times by eluting in PBS- buffer following storage at -20°C. The culture supernatant and the RBCs (1x10⁸ cells/ml) were mixed at a 1:1 (v/v) ratio, and incubated at 37°C for 15 h. After the incubation, samples were centrifuged at 1000 g 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) x 100]; where Ap, As and An are the absorbance of the positive control, test sample and negative control, respectively. The positive control was the

RBCs lysed with SDS (0.6%) plus PBS- buffer at a 1:1 (v/v) ratio, and the negative control was the RBCs suspension with RPMI plus PBS- buffer at a 1:1 (v/v) ratio. These tests were repeated five times.

Additional experiments were performed to determine the effect of heat treatment (100°C for 10 min) and addition of pepstatin A at final concentration of 15 µM on the haemolytic activity.

Molecular analysis related to a putative *C. tropicalis* haemolytic factor gene

C. tropicalis genomic DNA extraction was carried out as described by (Gácsér et al., 2005) with modifications. Briefly, 5 ml culture of the yeast in Sabouraud was grown overnight to stationary phase and cells were harvested by centrifugation at 1080 g for 5 min. The pellets were washed with sterile water and resuspended in 500 µl lysis buffer (TENTS) (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% v/v Triton-X-100, 10% w/v SDS, 10 mM NaAc and 1 mM EDTA) mixed with 500 µl phenol and 3 glass beads (425-600 microns). The suspension was vortexed at maximum speed for 3 min and centrifuged for 15 min at 13000 g. The supernatant was recovered, mixed with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and centrifuged for 15 min at 13000 g. The supernatant was transferred to a new tube and mixed with chloroform/isoamyl alcohol (24:1), centrifuged for 15 min at 13000 g and the aqueous phase was recovered, centrifuged for 15 min at 13000 g and the DNA precipitated with 2.5 volumes of chilled ethanol. The pellet was washed with 70% (v/v) ethanol, air-dried, and resuspended in 20 µl of H₂O. The quality and quantity of the isolated DNA were determined by 0.8% agarose gel electrophoresis in 1% TBE.

To amplify a *C. tropicalis* putative *HLP* (haemolysin-like protein) gene we employed a gene-specific primers for the *C. glabrata* *HLP* (Luo et al., 2004) and *C. tropicalis* genomic DNA as a template. PCR products were generated in 50 µl of a reaction mixture containing 4

μ l DNA (5 ng/ μ l), 612.5 μ mol of each deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen), 40 pmol each primer, and 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen). The cycling conditions were as follows: an initial denaturation step (5 min, 94°C), followed by 35 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (56.6°C, 30 s) and elongation (72°C, 1 min), with an additional extension (72°C, 10 min). All the PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR system (Eppendorf, Mastercycler gradient).

The PCR product obtained was sequenced using the DYEnamic ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) on MegaBACE 1000. The alignment of the nucleotide sequences and comparison with sequences in the databases were performed using BLAST tools available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *C. tropicalis* primers were designed using the software Gene Runner 3.05 (<http://www.generunner.com>).

Total RNA extraction and cDNA synthesis

C. tropicalis strain 7 was precultured in Sabouraud dextrose liquid medium and grown in submerged culture (180 rpm) at 37°C for 15 h. The resultant cultures were harvested and washed with destilated sterile water and a yeast suspension was added to fresh RPMI liquid medium (10^7 cells/ml) following incubation for up to 19 h. Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies), according to manufacturer's instruction, by mechanical disruption of cells with 3 glass beads (425-600 microns). RNA quality was assessed by determination of the OD₂₆₀/OD₂₈₀ absorption ratio, and the quality was considered maintained if the ratio was between 1.8 and 2.0. 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 mM) (Invitrogen), 2 μ l of 10x PCR Buffer (Invitrogen), dNTP mixture (200 μ M) (Invitrogen), Oligo (dT)12-18 primer (0.4 μ M)

(Invitrogen), RNase OUT (4 U) (Invitrogen) and reverse transcriptase RT M-ML V (0.5 U) (Invitrogen). The mixture was incubated at 42°C for 60 min.

Real time PCR

To quantify cDNA generated by reverse transcription from target RNA, quantitative real-time PCR was carried out in a PTC-200 DNA Engine Cycler with a Chromo4 fluorescence detector system (MJ Research). The 20 µl reaction was performed by using the Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies), Ct*HLP-F* (20 µM) and Ct*HLP-R* (20 µM) primers, and 2.0 µl of cDNA. 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, 56,6°C for 30 s and 72 °C for 1 min, with an additional extension (72°C, 10 min). Samples were analyzed in duplicate and normalized to the internal β-actin (Ct*ACT*) control levels, as described by Vandeputte et al (2005). Melting curve analysis was performed for each sample to assure that a single product was produced in each reaction, where the temperature was raised in 0.5°C/2 s from 50°C to 98°C. Quantitative RT-PCR data was analyzed using efficiency adjusted normalization method (Pfaffl, 2001).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the program BioEstat and Sisvar DEX/UFLA version 5.0. Kruskal – Wallis, Tukey and Student's t test were applied.

Results

Haemolytic activity on plate assay

With the aim to determine the conditions required for production of haemolytic factor by *C. tropicalis* isolates, we analyzed the effect of glucose on haemolytic activity. In glucose-free medium none of the isolates tested induced haemolysis on red blood cells. Furthermore, incubation in either presence or absence of 5% CO₂ was analyzed. This variable had no effect on haemolysis, since it was detected in both conditions (data not shown). All experiments were conducted in glucose-enriched blood agar and in absence of 5% CO₂.

At 24 h postinoculation, all 16 *C. tropicalis* isolates showed a greenish-grey halo, resembling alpha-haemolysis (partial lysis of the erythrocytes caused by the reduction of haemoglobin to methaemoglobin), surrounding the inoculum site. However, for all isolates, at 48 h postinoculation the zone of haemolysis enlarged and showed an internal translucent ring, resembling beta-haemolysis (complete lysis of the erythrocytes), surrounding by a peripheral greenish-grey halo (Fig. 1).

In order to obtain quantitative data of haemolysis, the beta-haemolytic zone was measured and the results were expressed as arbitrary units based on the diameter of the haemolytic zones relative to the colony size. Among isolates, the activity ranged from 1.1 to 1.24 arbitrary units. Colony size varied where the translucent ring had the same diameter (1 mm). Irrespective of the source of isolation there were no significant differences ($P > 0.05$) in the haemolytic activity amongst *C. tropicalis* isolates tested.

To exclude the possibility that the haemolysis was due to the production of extracellular hydrolases by *C. tropicalis*, such as a secreted aspartyl proteinase (Saps), the growth culture was treated with pepstatin A previous to the assay. Haemolytic activity was not inhibited by the addition of the aspartyl protease inhibitor (data not shown).

Haemolytic activity in the *C. tropicalis* culture supernatant

The activity of a haemolytic factor in the culture supernatant of *C. tropicalis* was also analyzed. *C. tropicalis* cells induced the release of haemoglobin by secreting a haemolytic factor.

The percentage of haemolysis obtained is shown in Fig. 2. After 18 h incubation the activity varied from 28.14 to 51.41 % of haemolysis among isolates (Fig. 2a). Longer incubation period (48 h) revealed significant higher ($P < 0.05$) haemolytic activities which varied from 21.42 to 67.10 % of haemolysis (Fig. 2b). Similarly to found in plate assays, there were no significant differences ($P > 0.05$) in the haemolytic activity amongst *C. tropicalis* isolates in neither of the incubation periods tested.

After growth, the number of yeast cells also varied among isolates, ranging from approximately 1×10^6 to 7×10^7 *Candida* cells (Fig. 2b). Considering cellular number different efficiencies on haemolysis are observed among isolates, being the highest efficiency observed for isolate 7 (isolated from blood).

Haemolytic activity was neither inhibited by heat treatment (100°C) nor by the addition of pepstatin A (data not shown).

Preliminary analysis of *CtHLP* expression

The employment of *C. tropicalis* genomic DNA as a template and gene-specific primers for the *C. glabrata HLP* gene (Luo et al., 2004) resulted in an amplicon of approximately 400 bp. After being sequenced and submitted to BLASTx analysis the fragment obtained showed high similarity (62% identity, E value 6×10^{-13}) to a *C. albicans* hypothetical protein SC5314 (CaO19.11047, access number XP 714985). Furthermore it was also high similar to a protein domain rich in threonine residues, which is a common feature of some proteins such as *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall mannoprotein.

The sequence obtained was also used to design gene-specific primers for a putative *CtHLP* gene of *C. tropicalis*. The employment of these primers was successfully applied against *C. tropicalis* genomic DNA which resulted in an amplicon of approximately 250 bp.

Primers for *CtHLP* and for an active reference control *CtACT* gene (actin house keeping gene) were used in expression analysis by the employment of real time PCR method. These primers were positive for both *CtHLP* and *CtACT* mRNA expression. As shown in Fig. 3 a putative haemolytic factor of *C. tropicalis* was highly expressed after 7 h incubation in RPMI medium (4.16-times higher compared to 1 h incubation). Further incubation resulted in decreased expression of *C. tropicalis CtHLP*.

Discussion

Non-albicans *Candida* species are emerging as both colonizers and pathogens. Recent epidemiological data indicate a shift in the incidence of infections from *C. albicans* to the non-albicans species, including *C. tropicalis*. In Brazil, *C. tropicalis* is a leading cause of candidemia and its epidemiology is similar to that of *C. albicans* (Nucci & Colombo, 2007). However, there still few data on virulence features of *C. tropicalis* (Haynes 2001), particularly the haemolytic attributes of this species.

The ability of pathogenic organisms to acquire elemental iron has been shown to be of pivotal importance in their survival and ability to establish infection within the mammalian host (Bullen, 1981). Since there is essentially no free iron in the human host, most pathogens acquire this indirectly from commonly available iron-containing compounds such as hemoglobin (Belanger et al., 1995), which access may be provided through lysis of erythrocytes.

Haemolytic activity is apparently widely distributed in *Candida* spp. and indicates the potential for the generation of localized acute haemolytic episodes (Luo et al., 2001). Pendrak

et al. (2004) proposed that haemoglobin is an important host factor for triggering a differentiation pathway necessary for establishing disseminated infections by *C. albicans*.

In the present report, we defined the conditions under which *C. tropicalis* can produce a haemolytic factor and we demonstrate its secretion into the culture medium.

Our results suggest that production of the haemolytic factor by *C. tropicalis* may be regulated by the presence of glucose, since in glucose-free medium no haemolysis was observed. Similar finding was previously observed for *C. albicans* (Manns et al., 1994) and non-albicans *Candida* species (Luo et al., 2001). Schuster et al. (2004) suggested that the haemolysis observed in the presence of glucose is due to ethanol generated by yeast fermentation of glucose, even under aerobic conditions.

Luo et al. (2001) demonstrated that many non-albicans *Candida* species obtained from clinical sources exhibit varying ability to produce up to two different types of haemolysins. Our results showed that 100% of *C. tropicalis* isolates demonstrated both alpha and beta haemolysis. Similarly to found by Luo et al. (2001), beta-haemolytic activity was seen only after 48 h followed by alpha haemolysis on 24 h of incubation.

In this study, we demonstrated for the first time that the haemolytic factor is secreted from *C. tropicalis* cultures (Fig. 2). Furthermore, we showed that there were no significant intra-species differences ($P > 0.005$) in the haemolytic activity among *C. tropicalis* isolates in neither of the incubation periods tested. This is an interesting feature since we analyzed isolates from different clinical sources. Similar data was described by *C. glabrata* isolates (Luo et al., 2004). According to these authors, the haemolytic activities detected as haemolysis zones on plate assay, did not reveal significative differences among clinical isolates. In our study, the analysis of isolates growth given by cell number counting allowed us to suggest different efficiencies on haemolysis among isolates, since after growth, the number of yeast cells varied among them.

As previously described by haemolytic factor produced by *C. albicans* (Watanabe et al., 1999), the haemolytic factor produced by *C. tropicalis* was also insensitive to proteolytic degradation and heat denaturation, suggesting that the active component responsible for the lysis is probably neither a protein nor presents proteolytic activity. Watanabe et al. (1999) characterized the *C. albicans* haemolytic factor as a mannoprotein which sugar moiety structure was identified as a cell-wall mannan.

With the attempt to analyze the molecular basis of the haemolytic factor produced by *C. tropicalis*, we obtained a DNA fragment that was high similar to a protein which domain is rich in threonine residues. The fact that cell-wall mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* has also been shown to be rich in such residues and that the *C. albicans* haemolytic factor has been characterized as a mannoprotein (Watanabe et al., 1999) allowed us to consider that the *C. tropicalis* fragment obtained may be related to a haemolytic factor in this species.

In order to analyze the possible correlation between the mRNA expression of *CtHLP* and the haemolytic activity in *C. tropicalis* we employed a quantitative real time PCR method since it is easy to perform, provides the necessary accuracy and produces reliable as well as rapid quantification results.

Luo et al. (2004) showed a significant positive correlation between the phenotypic and genotypic expression of haemolytic activity in *C. glabrata*. At present there are no data to corroborate that the haemolysin-like gene is involved in the phenotypic expression of the haemolysis trait of *C. tropicalis*.

In preliminary experiments, the employment of the designed specific primers for a putative *CtHLP* gene of *C. tropicalis* and an active reference control (*CtACT* gene) allowed us to verify that the putative haemolytic factor is differently expressed as function of the incubation time. Higher expression appears to occur in earlier incubation periods (shorter than

7 h). Further studies are in progress in order to define better incubation periods needed for CtHLP expression and its correlation with secreted haemolytic activity in *C. tropicalis*.

Acknowledgements This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UEL - Brazil. D.F. is fellowship-holder of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ & Barth AL (2005) Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* **9**: 411-418.
- Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, dAzevedo PA & Severo LC (2004) Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst med Trop* **46**: 239-241.
- Belanger M, Begin C & Jacques M (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bin pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**: 656-662.
- Bullen J (1981) The significance of iron in infection. *Rev Infec Dis* **3**: 1127-138.
- Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kusan EJU & Nucci M (2003a) Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* **41**: 235-239.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D & Morgan J (2006) Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. *J Clin Microbiol* **44**: 2816-2823.
- Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, Lupinacci R, Sable C &

- Kartsonis N (2003b) Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 470-474.
- Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O & Ozlu N (2007) Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses* **50**: 52-57.
- Dostál J, hamal P, Pavlícková L, Soucek M, Ruml T, Pichová I & Hrusková-Heidingsfeldová O (2003) Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol* **41**: 712-716.
- Furlaneto-Maia L, Specian AFL, Thorn DSW, Oliveira MT & Furlaneto MC (2007) Study of the incidence of clinical samples belonging to the genus *Candida* obtained from different anatomic sites. *Acta Sci Health Sci* **29**: 33-37.
- Gácsér A, Salomon S & Schafer W (2005) Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* **245**: 117-121.
- Haynes K (2001) Virulence in *Candida* species. *TRENDS Microbiol* **9**: 591-596.
- Kantarcioglu AS & Yücel A (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses* **45**: 160-165.
- Krcmery V & Barnes A (2002) Non-*albicans* *Candida* spp. Causing fungaemia pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**: 243-260.
- Lachke SA, Srikantha T, Tsai LK, Daniels K & Soll DR (2000) Phenotypic swithing in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene *MT-II* and the newly discovered hemolysin gene *HLP*. *Infect Immun* **68**: 884-895.

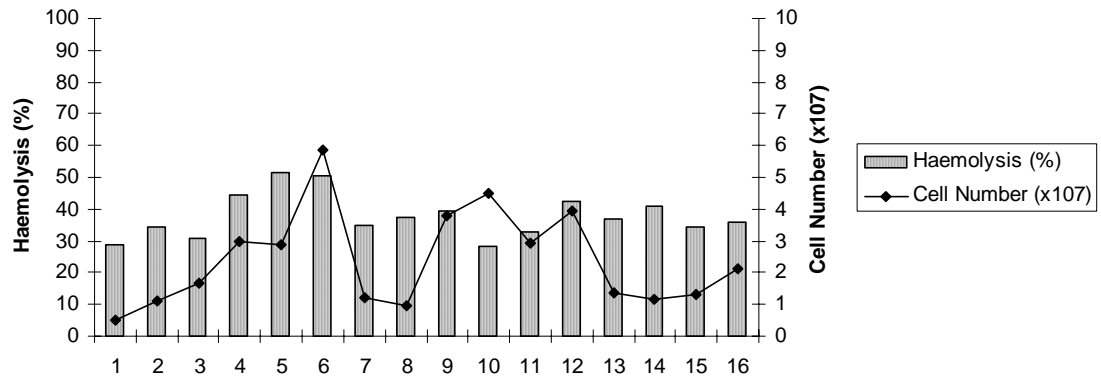
- Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC & Chang TC (2003) Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 693-696.
- Luo G, Samaranayake LP, Yau JY (2001) *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971-2974.
- Luo G, Samaranayake LP, Cheung BPK & Tang G (2004) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vivo haemolysin production. *APMIS* 112: 283-290.
- Manns JM, Mosser DM & Buckley HR (1994) Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 62: 5154-5156.
- Marol S & Yücesoy (2008) Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses* 51: 40-49.
- Medrano DJA, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Rocha MFG, Rabenhorst SHB & Sidrim JJ (2006) Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst med Trop* 48: 17-20.
- Nucci M & Colombo AL (2007) Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 77-82.
- Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindall, 1988.
- Paffl MV (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007.
- Pendrak ML, Yan SS & Roberts DD (2004) Sensing the host environment: recognition of haemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* 426: 148-156.
- Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Da Silva BMC, Silva EH,

- Gandra RF, Silva EG, Auler ME & Paula CR (2005) Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the public hospital, Botucatu, São Paulo. *J Mycol Med* **15**: 13-21.
- Shuster A, Osherov N & Rosenberg M (2004) Alcohol-mediated haemolysis in yeast. *Yeast* **21**: 1335-1342.
- Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, & Bouchara JP (2005) Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 4608-4615.
- Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T & Matsumoto T (1997) Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 350-353.
- 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.
- Yang Y-L, Cheng H-H & Lo H-J (2006) Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from different age populations in Taiwan (2006) *Med Mycol* **44**: 237-242.
- Zaugg C, Borg-von Zepelin M, Reichard U, sanglard D & Monod M (2001) Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infct Immun* **69**: 405-412.



Figure 1. Representative photograph showing the haemolysis of sheep blood agar medium (supplemented with 3% glucose) produced by *C. tropicalis* following growth for 24 and 48 h. (a) alpha-haemolysis observed after 24 h incubation and (b) beta-haemolysis observed after 48 h incubation.

(a)



(b)

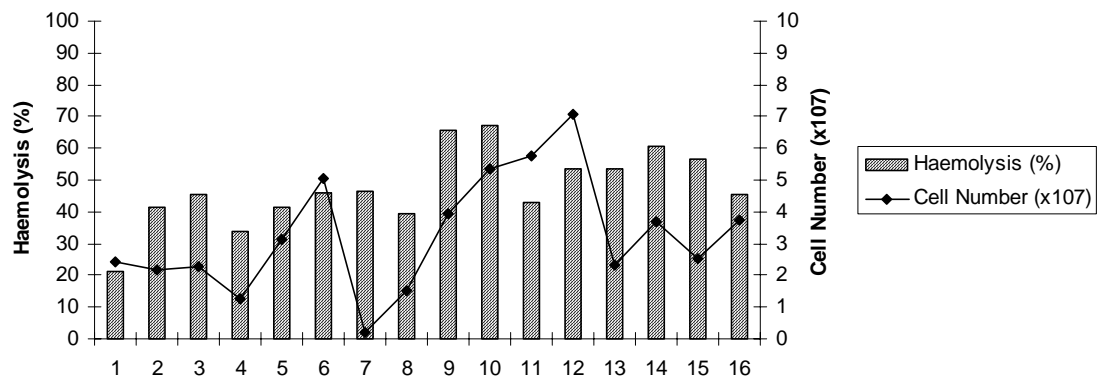


Figure 2. Cellular number and haemolytic activity from culture supernatant of *C. tropicalis* isolates after growth in RPMI medium for 18 h (a) and 48 h (b). The results are means of five independent experiments. Activities are represented as percentage of haemolysis.

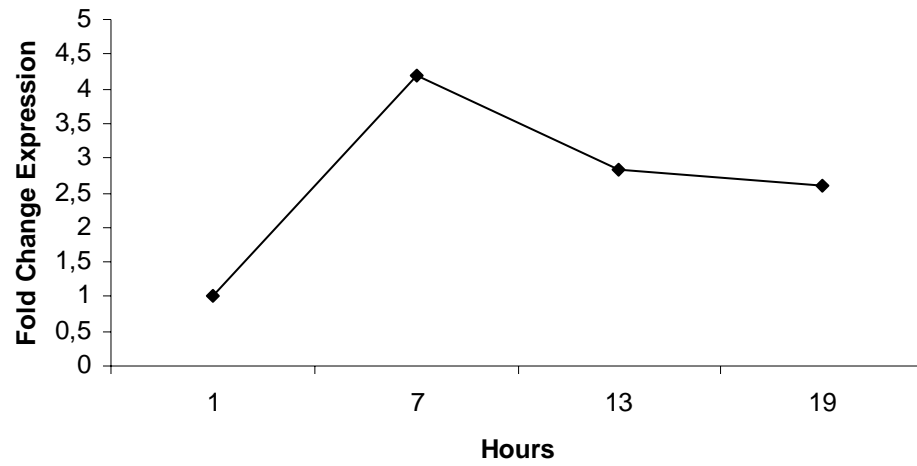


Figure 3. Effect of time incubation on expression of *CtHLP* in *C. tropicalis*. The expression is indicated as a fold-change. The experiment was performed twice, and the figure represents the media.