



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL FAVERO

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE FATOR
HEMOLÍTICO EM *Candida* spp.**

Londrina
2012

DANIEL FAVERO

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE FATOR
HEMOLÍTICO EM *Candida* spp.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F273a Favero, Daniel.

Análise da produção e expressão de fator hemolítico em
Candida spp. / Daniel Favero. – Londrina, 2012.
91 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, 2012.

Inclui bibliografia.

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

CDU 579:582.28

DANIEL FAVERO

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE FATOR HEMOLÍTICO
EM *Candida* spp.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr Rinaldo Ferreira Gandra
UNIOESTE – Cascavel - PR

Profa. Dra. Ionice Felipe
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra Ivete Conchon Costa
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de julho de 2012.

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 são 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 ESPECIAIS

A Deus, por suas bênçãos, proteção e amparo. Pelas incontáveis graças que concedeu, por fazer a sua vontade na minha vida e por todas as vezes que me perdoou. Enfim, por tudo que faz, especialmente por aquilo que não percebemos.

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento destes trabalhos, tive a grata oportunidade de me aproximar um pouco mais do mundo do conhecimento. Ainda, recebi o presente de conhecer pessoas que levarei para o resto de minha vida, como grandes amigos e amigas, parceiros para todas as horas, e como pude perceber, especialmente prontos para as mais difíceis. Exemplos a serem seguidos como profissionais e em sua conduta social. Assim, é com enorme prazer que expresso meus mais sinceros agradecimentos:

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, orientadora destes estudos, por ter-me recebido em seu laboratório com grande confiança, por ter-se dedicado com tanto esmero na construção de minha formação profissional. Mas especialmente, por dividir seus conhecimentos com generosidade, pela amizade, simpatia e paciência durante todo o nosso tempo de convívio. Guardarei comigo sempre enorme orgulho de ter sido seu orientado.

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia, por todos os ensinamentos e muitos incentivos, pela prontidão a ajudar, por seu bom senso e clareza. Obrigado pela sua simpatia, pelos conselhos e especialmente pela paciência.

Ao Professor Dr. Laurival Antonio Vilas Boas pelo bom humor, pelos ensinamentos e auxílios durante minha pesquisa, por sua disponibilidade, e em especial pela amizade.

A amiga e companheira de trabalho Emanuelle Julio Galvão de França por seu enorme companheirismo, por todas as suas muitas ajudas, por sua solidariedade, fidelidade, confiança, e acima de tudo, por sempre me fazer sentir que não estaria sozinho nos momentos de dificuldades.

Ao amigo e companheiro de trabalho Marcelo Tempesta de Oliveira, por todas as ajudas, por sua solidariedade, conselhos e companheirismo, por partilhar comigo os anseios e alegrias provenientes do dia a dia, e pela boa companhia dentro e fora do laboratório.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia da UEL, pelos bons 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 destes trabalhos.

Aos amigos de laboratório e dos laboratórios vizinhos: Alane, Helena, Kátia, Márcia, Rosana, Viviane, Daniele, Julie, Lara, Mateus, Thiago e Marla. Agradeço 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 enriquecerem com a amizade de vocês.

Ao amigo Oswaldo, 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 Doutorado em Microbiologia, os quais eu nunca esquecerei.

À todas as amizades estabelecidas no período de desenvolvimento deste trabalho, que por virtude de espaço não irei citar aqui, mas que guardo grande orgulho de tê-las construído.

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 dos meus sonhos. E aos meus irmãos Ricardo, Cristina e Denise, por todos os incentivos e orgulhos que sempre me deram.

Aos meus amigos de perto e de longe...

OBRIGADO POR TUDO!!!

FAVERO, Daniel. **Análise da produção e expressão de fator hemolítico em *Candida* spp.** 2013. 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

A produção de fator hemolítico, embora ainda pouco estudada, é reconhecida como um importante fator de virulência em espécies de *Candida*. Neste trabalho, nós analisamos a produção do fator hemolítico por isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, a expressão do gene que codifica para uma possível proteína semelhante à hemolisina (HLP), o possível efeito de eritrócitos (RBCs) sobre a expressão do gene *HLP* e sobre a atividade hemolítica, bem como a correlação entre este perfil de expressão e a atividade hemolítica em isolados clínicos *C. tropicalis*. Dados de hemólise em meio solidificado revelaram que a maioria dos isolados de *C. albicans* apresentaram níveis moderados de atividade hemolítica, enquanto que a maioria dos isolados de *C. tropicalis* níveis elevados. Nenhum dos isolados testados de *C. parapsilosis* exibiu hemólise. Dados de produção do fator hemolítico liberados nos sobrenadantes de cultivo, revelaram diferentes níveis de hemólise entre as espécies, onde os isolados de *C. tropicalis* apresentaram a maior produção ($P < 0,05$), seguidos dos isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Não houve diferenças intraespecíficas significativas ($P > 0,05$) na atividade hemolítica. Dois perfis de hemólise foram observados entre os isolados de *C. tropicalis* cultivados em presença de RBCs: 66,7% evidenciaram aumentos estatisticamente significativos na promoção de hemólise ($P < 0,05$), enquanto 33,3% evidenciaram uma diminuição nesta promoção, sem diferenças significativas. Em nível molecular, todos os isolados de *C. tropicalis* foram positivos para a expressão do gene *HLP*. Os perfis de expressão deste gene permitiram verificar que ele é diferentemente expresso em função da presença de RBCs de uma maneira isolado-dependente. A comparação deste perfil de expressão e a atividade hemolítica dos isolados de *C. tropicalis* mostrou uma correlação altamente positiva. Assim, nossos dados ampliam o conhecimento sobre a regulação e a base molecular da atividade hemolítica em *Candida* spp. Este é o primeiro estudo que revela diferenças espécie-específicas na produção de fator hemolítico por isolados de *Candida* associados com infecções de corrente sanguínea. Evidencia ainda, pela primeira vez, a secreção de um fator hemolítico por isolados de *C. parapsilosis*, o papel do gene *HLP* na hemólise de *C. tropicalis*, bem como o fato de que RBCs podem induzir alterações nos níveis de transcrição do gene *HLP* em *C. tropicalis*.

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

FAVERO, Daniel. **Analysis of the production and expression of hemolytic factor in *Candida* spp.** 2013. 91p. Thesis (Doctorate Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

ABSTRACT

The production of hemolytic factor, although remains poor evaluated, is recognized as an important virulence factor in *Candida* species. In this study we analyze the production of hemolytic factor by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* clinical isolates, as well as the expression of a putative gene encoding a hemolysin-like protein (*HLP*), the possible effect of Red Blood Cells (RBCs) on both the *HLP* gene expression and the hemolytic activity, and assessed a correlation between the expression profile of *HLP* gene and the hemolytic activity in *C. tropicalis* clinical isolates. Data of hemolysis on plate assay revealed that the majority of *C. albicans* isolates produced mild hemolytic activity whereas the majority of *C. tropicalis* produced strong activity. None of the tested *C. parapsilosis* isolates exhibited hemolysis. Data of hemolytic factor released in the culture supernatant reveals different degrees of hemolysis, where *C. tropicalis* isolates exhibited the highest production ($P<0.05$) followed by *C. albicans* and *C. parapsilosis* isolates. There were no significant intra-species differences ($P>0.05$) in the hemolytic activity among *Candida* species isolates. Two profiles of hemolysis were observed among *C. tropicalis* isolates cultured in presence of RBCs: 66.7 %, showed an increase in their hemolysis promotion at significant levels ($P<0.05$), whereas 33.3 % showed a decrease in this promotion, with no significant differences. At molecular level, all *C. tropicalis* isolates were positive for *HLP* expression. The expression profile of *HLP* gene allowed us to verify that the putative *HLP* gene is differently expressed as function of the RBCs presence in an isolate-dependent manner. The comparison of this profile and the hemolytic activity of the *C. tropicalis* isolates showed a highly positive correlation. Our data extend our knowledge about the regulation and molecular basis of hemolytic activity in *Candida* spp. To the best of our knowledge, this is the first report of species-specific differences in hemolytic factor production by *Candida* isolates associated with bloodstream infections. We have further showed for the first time the secretion of a hemolytic factor by isolates of *C. parapsilosis*, evidences a role of *HLP* gene in *C. tropicalis* hemolysis as well as the fact that RBCs can induces changes in transcriptional levels of the putative *HLP* gene in this species.

Keywords: *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis*. Hemolytic factor. Virulence factor.

LISTA DE TABELAS

PART I

Table 1 – Hemolytic activity by bloodstream *Candida* isolates..... 67

PART II

Table 1 – Hemolysis and relative expression of the *HLP* gene by *Candida tropicalis* clinical isolates following growth in either absence (RPMI medium) or presence of human red blood cells (RBCs) (RPMI+RBCs)..... 89

Table 2 – Relative expression of the *HLP* gene by *Candida tropicalis* clinical isolates following growth in either absence (RPMI medium) or presence of human red blood cells (RBCs) (RPMI+RBCs) 89

LISTA DE FIGURAS

PART I

Fig. 1 – Photograph showing the hemolysis of sheep blood induced by different *Candida* species. *C. albicans* (a), *C. tropicalis* (b) and *C. parapsilosis* (c). 68

Fig. 2 – Hemolytic activity of *Candida* species. The results are mean values of three independent experiments. * represent a significant difference ($P < 0.05$) according to Kruskal-Wallis test. Vertical lines indicate maximum and minimum values, upper and lower lines of the boxes indicate percentiles 75 and 25, respectively and the traced line of each box indicates median value. 68

Fig. 3 – Representative photograph showing hemolysis induced by a hemolytic factor produced by *Candida* spp. after growth for 48 h (A) and the hemoglobin released (supernatant obtained following centrifugation at 1000 g for 2 min) (B). (+) positive control (total lyses of RBCs in presence of SDS), (a) *C. albicans* isolate 238.05, (b) *C. tropicalis* isolate 14.07, (c) *C. parapsilosis* isolate 75.07 showing different degrees of hemolysis and (-) negative control (RBCs resuspended in RPMI plus PBS buffer)..... 69

Fig. 4 – Hemolysis from culture supernatant of *Candida* isolates after growth in RPMI medium for 48 h. The results are means of three independent experiments..... 69

PART II

Fig. 1 – Hydrophobicity profile obtained by TMpred analyses. (A) TMpred obtained for *C. tropicalis* predicted protein. (B) TMpred obtained for *C. albicans* hypothetical protein. 90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS GERAIS	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	16
3.2	BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES: <i>C. ALBICANS</i> , <i>C. TROPICALIS</i> E <i>C. PARAPSILOSIS</i>	17
3.3	RELAÇÃO <i>CANDIDA</i> -HOSPEDEIRO	23
3.4	FATORES DE VIRULÊNCIA	26
3.5	FATOR HEMOLÍTICO	288
3.6	PAREDE CELULAR	32
3.7	PROTEÍNAS DE PAREDE CELULAR (CWPs)	35
	REFERÊNCIAS	38
	PARTE I - HEMOLYTIC FACTOR PRODUCTION IS VARIABLE AMONG <i>Candida</i> SPECIES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES	55
	PARTE II - HEMOLYTIC FACTOR GENE EXPRESSION IN <i>Candida tropicalis</i> CLINICAL ISOLATES	700
	CONCLUSÕES	911

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos relacionados a infecções em humanos, estando entre os principais causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo. Nas últimas décadas a incidência de infecções oportunistas causadas por estes micro-organismos tem crescido significativamente. Estas infecções estão associadas a altas taxas de mortalidade, longos períodos de internação e alto custo de tratamento, acentuando a importância clínica destes micro-organismos.

Diversos estudos demonstram uma mudança relevante na epidemiologia das infecções provocadas por *Candida* spp. De forma que, embora tais estudos confirmem a prevalência de *Candida albicans* em isolados clínicos, indicam também aumentos nas frequências de isolamento de outras espécies. Sendo que, em diversas regiões, espécies não-*albicans* como *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* têm sido as mais frequentemente isoladas após *C. albicans*, representando os segundos e terceiros agentes etiológicos mais comuns em candidemias. De fato, uma inversão do perfil tradicional de prevalência de *C. albicans* sobre as demais espécies tem sido cada vez mais observada, e relatos da igualdade e até superação na frequência de isolamento de espécies não-*albicans* sobre *C. albicans* são comuns atualmente.

Infecções provocadas por *C. tropicalis* geralmente tem origem a partir da microbiota do paciente, sendo comuns principalmente em indivíduos imunocomprometidos. *C. parapsilosis* também é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis, e por apresentar ampla capacidade de formação de biofilme esta espécie é frequentemente relacionada a surtos hospitalares.

A detecção destas leveduras, tem sido frequentemente associada com o desenvolvimento das infecções fúngicas sistêmicas.

Sabe-se que as espécies de *Candida* diferem significativamente quanto à presença e expressão de genes relacionados à virulência, sendo os principais deles: 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. Mais recentemente, o fator hemolítico tem sido reconhecido como um importante atributo de virulência em espécies de *Candida*, e está relacionado à capacidade do patógeno em adquirir íons ferro a partir da hemoglobina. Ao

contrário dos demais determinantes de virulência anteriormente citados, até o momento, são poucos os dados relativos à atividade hemolítica, principalmente entre espécies não-*albicans* como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

As diferentes espécies do gênero *Candida* modulam sua maquinaria genética de forma variável considerando o potencial de virulência presente em cada célula/linhagem, bem como de acordo com a necessidade do fungo. Assim, estes microorganismos podem causar diversos tipos de infecções em humanos e também adaptar-se rapidamente ao microambiente em que se encontram, possibilitando a sobrevivência nos mais variados habitats.

Desta forma, frente à acentuada emergência de espécies do gênero *Candida* em infecções humanas, em particular em nossa região, e à escassez de informações sobre a produção e expressão do fator hemolítico por tais espécies, em especial por espécies não-*albicans*, a realização de estudos que visem à caracterização e melhor compreensão da produção e condições de expressão do fator hemolítico por *Candida* spp. assume especial relevância.

2 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a produção do fator hemolítico em espécies de *Candida* em nível fenotípico e genotípico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de atividade hemolítica de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*;
- Avaliar os níveis de expressão do gene *HLP* em *C. tropicalis*;
- Verificar o possível efeito da presença eritrócitos (RBCs) na expressão do gene *HLP* e na atividade hemolítica de isolados de *C. tropicalis*;
- Verificar a possível correlação entre os níveis de transcritos do gene *HLP* e os níveis de hemólise promovidos por isolados de *C. tropicalis*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÊNERO *CANDIDA*

Leveduras do gênero *Candida* estão frequentemente presentes em humanos de forma comensal, adaptadas a colonizar praticamente todas as regiões do corpo, inclusive em indivíduos saudáveis, mas especialmente compondo a microbiota normal da pele e de membranas mucosas como a cavidade bucal e trato gastrointestinal e urogenital, estando assim em equilíbrio com a microbiota normal e o sistema imune do hospedeiro (SCHOFIELD et al., 2003; TAVANTI et al., 2004; MÉAN et al., 2008; RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; HUBE, 2009; LASS-FLÖRL, 2009; HA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Contudo, determinados fatores predisponentes 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 (afetando pele, cabelo, unhas, e membranas mucosas) até infecções sistêmicas (envolvendo os principais órgãos do corpo). 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 (SCHOFIELD et al., 2003; TAVANTI et al., 2004; MÉAN et al., 2008; HUBE, 2009; HA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Os principais fatores que predispõem ao desencadeamento de infecções oportunistas por este gênero são a colonização da pele e de membranas mucosas com *Candida* spp., e alterações das barreiras naturais do hospedeiro (feridas, cirurgias, e inserção de cateteres intravasculares e urinários) (MÉAN et al., 2008).

Ainda, dentre os fatores geradores do estado de predisposição, destacam-se também aqueles relacionados ao imunocomprometimento dos pacientes, como o provocado pela quimioterapia de combate ao câncer, doenças como AIDS, terapias imunossupressoras devido a transplantes de órgãos, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro de ação, diabetes mellitus, nutrição parenteral, entre outros. A má higiene e alimentação (dieta rica em carboidratos), 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 predisponentes (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN; MORGAN, 2002; DE LEON et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; NAGLIK et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; KOJIC;

DAROUICHE, 2004; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; BOUZA; MUNOZ, 2008; HUBE, 2009; HA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

O trato gastrointestinal, a pele e o trato urogenital são os principais portais de entrada para infecções causadas por espécies *Candida*. De forma que, a colonização por *Candida* spp. foi claramente estabelecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de candidíases invasivas. Além disso, a colonização induzida por alterações da flora endógena resultantes de terapia prolongada com antibióticos de amplo espectro, a perda da integridade da pele e barreiras das mucosas, cirurgias, nutrição parenteral, insuficiência renal aguda, hemodiálise e o tratamento com agentes imunossupressores também são considerados importantes fatores de risco (MÉAN et al., 2008).

Desta forma, a frequência das infecções causadas por *Candida* spp. vem aumentando mundialmente devido aos múltiplos fatores predisponentes, que facilitam a conversão da forma comensal à existência parasitária, e 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. Isto faz com que espécies deste gênero sejam consideradas micro-organismos de grande importância clínica, estando também entre os principais agentes causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo (WEY et al., 1988; PITTET; WENZEL, 1995; DIEKEMA et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003; KOJIC; DAROUICHE, 2004; ALMIRANTE et al., 2005; MORRELL et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; MÉAN et al., 2008; HA et al., 2011; NUCCI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Conseqüentemente, embora de forma geral os níveis de mortalidade associados a diferentes micro-organismos tenham declinado com a administração precoce de agentes antibióticos e antifúngicos, as infecções fúngicas sistêmicas, especialmente as causadas por espécies do gênero *Candida*, têm sido crescentemente reconhecidas como importantes causas de morbidade e mortalidade em humanos (SILVA et al., 2012).

3.2 BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES: *C. ALBICANS*, *C. TROPICALIS* E *C. PARAPSILOSIS*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família *Candidaceae* (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy). Fungos ubíquos na natureza,

podem ser encontrados em solos, plantas, ambientes aquáticos e em animais. Das mais de 150 espécies, cerca de 20 já foram relatadas como agentes etiológicos de um amplo espectro de infecções em humanos (WANG et al., 2008; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA; MUNOZ, 2008; MÉAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; CHAI et al., 2010; HA et al., 2011; NUCCI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

A análise filogenética do gênero, aprofundada com a crescente quantidade de dados relativos a sequências genômicas, revela que *C. tropicalis* é a segunda espécie mais relacionada à *C. albicans* (reflexo de sua elevada similaridade genética com tal espécie) (BUTLER et al., 2009), sendo precedida apenas por *Candida dubliniensis*, e seguida por *C. parapsilosis* (FITZPATRICK et al., 2006; CHAI et al., 2010).

Tanto *C. albicans* quanto *C. tropicalis* são fungos polimórficos, podendo existir na forma de leveduras propriamente ditas (blastocônídios) ou como pseudo-micélios (elementos longos e ramificados portando conídios isolados). São espécies verdadeiramente polimórficas, com capacidade de formar hifas e / ou pseudo-hifas (LARONE, 2002; SILVA et al., 2012). Já *C. parapsilosis* não produz hifas verdadeiras, mas pode gerar pseudo-hifas que são caracteristicamente grandes e curvas, geralmente referidas como "células gigantes" (LARONE, 2002; TROFA et al., 2008). Assim, no gênero *Candida* a propriedade de formar hifas verdadeiras somente é compartilhada por *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (SUZUKI et al., 1991; CHAI et al., 2010).

Nas últimas décadas infecções causadas por espécies do gênero *Candida* têm se tornado cada vez mais frequentes, correspondendo atualmente a sexta forma mais comum de infecção patogênica. Indivíduos hospitalizados ou imunodeficientes compõem seu principal grupo de risco. As leveduras deste gênero têm sido assim as espécies fúngicas mais frequentemente isoladas a partir de culturas sanguíneas em pacientes hospitalizados (PFALLER et al., 1998, 2010). Ainda, espécies de *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 saudáveis 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; SOBEL, 1996; SAFDAR et al., 2001; AKPAN; MORGAN, 2002; VARGAS; JOLY, 2002; DE REPENTIGNY et al., 2004; RICHTER et al., 2005).

Entre as infecções invasivas causadas por espécies do gênero *Candida*, merecem destaque os casos de infecção de corrente sanguínea, complicação denominada

como candidemia (COLOMBO E GUIMARÃES, 2003). Candidemias representam a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas em hospitais terciários americanos. Tais infecções apresentam elevados índices de incidência nas mais diversas regiões demográficas, e implicações relevantes quanto aos custos, dificuldades de tratamento e quanto às taxas de mortalidade (WENZEL, 1995; EDMOND et al., 1999; OLAECHEA et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004; MEDRANO et al., 2006; MÉAN et al., 2008; SHORR et al., 2009; HA et al., 2011; NUCCI et al., 2010).

No Brasil, a incidência de candidemias (infecções sistêmicas de corrente sanguínea causada por *Candida* spp.) varia de 147 a 198 casos por 100.000 pacientes (COLOMBO; 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).

Infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* podem ser letais, sendo que em adultos a taxa de mortalidade pode chegar a 50% e em crianças acima de 65% (PFALLER et al., 1996).

Historicamente, dentre as espécies de *Candida* isoladas de humanos, *C. albicans* mostra-se a mais comum, tanto em indivíduos saudáveis quanto em doentes. Contudo, muito embora os níveis de isolamento desta espécie possam chegar a 80% dos casos, a frequência de infecções causadas por outras espécies (*Candida* não-*albicans*) tem crescido significativamente nos últimos anos (COLOMBO et al., 2003; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007; MÉAN et al., 2008; PFALLER et al., 2010; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Este crescimento nas taxas de isolamento de *Candidas* não-*albicans* pode estar, ao menos parcialmente, relacionado à melhorias nos métodos de diagnóstico, como o uso de meios cromogênicos capazes de diferenciar espécies do gênero, assim como a introdução de técnicas de biologia molecular na rotina de diagnósticos (LIGUORI et al., 2009). Todavia, a elevada prevalência de espécies não-*albicans* em infecções humanas, também deve ser um reflexo de seus elevados níveis de resistência, que são inerentes a determinadas espécies, a certas drogas antifúngicas (GONZALEZ et al., 2008), de forma que isto promova a persistência destas espécies em infecções mistas tratadas com antifúngicos tradicionais, relativamente à *C. albicans* (SILVA et al., 2012).

Muito embora nas últimas décadas tenha havido o aumento nas taxas de isolamento de outras espécies do gênero, *C. albicans* permanece sendo a espécie de *Candida* mais frequentemente isolada. Tal espécie pode ser encontrada em superfícies cutâneas e mucosas como comensal, constituindo um membro da microbiota normal da população

saudável. Além disso, pode ser responsável por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal e orofaríngea, até infecções sistêmicas com disseminação para órgãos parenquimais. Assim, tem apresentado um papel de grande relevo clínico, inclusive como patógeno nosocomial, representando a quarta principal causa deste tipo de infecção em algumas regiões do mundo e com mortalidade atribuída de cerca de 35% (CALDERONE; FONZI 2001; RUHNKE; MASCHMEYER 2002; SILVA et al., 2012)

No Brasil, Colombo et al. (2006), realizaram pesquisa de candidemia em 11 centros médicos, levantando dados referentes aos anos de 2003 a 2004, detectaram *C. albicans* como a espécie mais comum (40,9%), seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%).

Embora *C. albicans* seja a espécie de *Candida* predominante na maioria dos estudos epidemiológicos, é importante ressaltar que existem variações significativas nas espécies de *Candida* isoladas, dependendo da região geográfica e do grupo de pacientes, com algumas espécies não-*albicans* sendo mais prevalentes em certos países, mesmo em comparação à *C. albicans* (COLOMBO et al. 2003; PFALLER et al., 2004).

Candida tropicalis é uma das três espécies não-*albicans* mais comumente isoladas. Sendo que, na América Latina e em determinadas regiões europeias, tem sido a espécie mais frequentemente isolada após *C. albicans*. Assim, diversos estudos mostram que *C. tropicalis* tem sido reconhecida como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemias (PFALLER et al., 2000, 2001, 2002a, 2002b, 2003, 2004; 2008, 2009; SAFDAR et al., 2001; DIEKEMA et al., 2002; GOLDANI; MARIO, 2003; HAJJEH et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; NUCCI; COLOMBO, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; CHAI et al., 2010; MARRA et al., 2011).

Em um recente estudo epidemiológico realizado em 11 centros médicos brasileiros, *C. tropicalis* foi a segunda espécie de *Candida* mais frequentemente encontrada, sendo responsável por 33-48% dos casos de candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; MIRANDA et al, 2009). Além disso, *C. tropicalis* é frequentemente isolada de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, especialmente de pacientes que necessitam de cateterização prolongada, recebendo antibióticos de amplo espectro ou com câncer (KAUFFMAN et al, 2000; RHO et al, 2004; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; NUCCI; COLOMBO, 2007).

Desta forma, *C. tropicalis* parece exibir um maior potencial de disseminação em indivíduos neutropênicos em comparação com *C. albicans* e outras espécies não-*albicans* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007). Colombo et al. (2006) observou que o número de casos de candidemia causada por esta espécie, 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 ainda mais problemática.

Em estudo epidemiológico conduzido no Hospital Universitário de Londrina/PR, foi observado que 32,5% dos casos de candidemia foram provocados por *C. tropicalis*, enquanto apenas 25% por *C. albicans*. Neste mesmo estudo *C. tropicalis* correspondeu a 30% dos isolados obtidos de sítios superficiais, e a 52% dos casos de candidúria (FURLANETO et al., 2011). Em estudo conduzido por Oliveira et al. (2001), 53% dos isolados de urina corresponderam a *C. tropicalis*, e somente 36% a *C. albicans*.

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 frequentemente associada com o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas (ZAUGG et al., 2001).

De acordo com Kontoyiannis et al. (2001), existem diferenças nos fatores de risco de fungemias causadas por *C. tropicalis* e *C. albicans*, sendo a primeira mais persistente e levando a mais tempo de internação em unidades de terapia intensiva. De fato, alguns estudos epidemiológicos (KRCMERY, 1999a; KONTOYIANNIS et al, 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; SILVA et al., 2012) documentaram que *C. tropicalis* foi associada a níveis de mortalidade mais elevados do que outras espécies não-*albicans* e inclusive do que *C. albicans*. Essa propensão para a disseminação e a elevada mortalidade associada de *C. tropicalis* pode estar relacionada aos fatores de virulência apresentados por esta espécie, tais como a formação de biofilme, secreção de proteinases, dimorfismo entre outros (KRCMERY, 1999b; NEGRI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

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 Regional Universitário de Londrina (40% dos isolados), sendo ainda que esta espécie apresentou elevados índices de resistência aos antifúngicos comumente empregados em sua terapia (FAVERO et al., 2006).

Ainda, no Brasil, além de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* tem sido a espécie não-*albicans* mais frequentemente isolada (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010) e segundo estudo conduzido por Pfaller et al. (2005), os índices de isolamento destas duas espécies em todo o mundo aumentaram 2,9% e 3,1% respectivamente, no período de 1997 a 2003.

De fato, estudos indicam que *C. parapsilosis* é muitas vezes a segunda espécie do gênero *Candida* mais frequentemente isolada de hemoculturas (ALMIRANTE et al., 2006; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008). Sendo também um dos fungos mais comumente encontrado em mãos humanas (BONASSOLI et al., 2005) e em locais do corpo normalmente estéreis em pacientes hospitalizados. Esta espécie corresponde a 15,5% dos isolados de *Candida* na América do Norte, 16,3% na Europa, e 23,4% na América Latina, superada apenas por *C. albicans* (51,5%, 47,8% e 36,5%, respectivamente), *Candida glabrata* (21,3%) na América do Norte (MESSER ET AL., 2006) e em alguns estudos por *C. tropicalis*, como citado anteriormente (OLIVEIRA et al., 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007; MIRANDA et al., 2009; ROTA, 2009). Todavia, fungemias causadas por *C. parapsilosis* apresentam uma menor taxa de mortalidade (4%) em comparação com as causadas por *C. albicans*, *C. glabrata* (KOSSOFF et al., 1998).

À semelhança de outras espécies de *Candida*, a incidência aumentada de infecções provocadas por *C. parapsilosis* tem sido atribuída a uma variedade de fatores de risco, incluindo sua capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos intravasculares e a sua persistência no ambiente hospitalar. Ainda, é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis, o que facilita sua propagação nosocomial por meio das mãos de profissionais da área da saúde. Tais características propiciam que *C. parapsilosis* seja cada vez mais relacionada a surtos hospitalares, originando infecções principalmente em neonatos prematuros (DE BERNARDIS et al., 1999; SHIN et al., 2002; KUHN et al., 2004; ALMIRANTE, et al., 2005; BONASSOLI et al., 2005; VAN ASBECK et al., 2007; PFALLER et al., 2008).

Na Espanha e Estados Unidos foi observado que *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais comumente encontrada na corrente sanguínea de neonatos (ALMIRANTE et al., 2005, 2006; TROFA et al., 2008). Este fato poderia ser explicado pela presença do patógeno nas mãos dos profissionais de saúde. Pfaller et al. (2005, 2006a, 2006b, 2008, 2009) também encontraram em diversos estudos aliados ao programa SENTRY de vigilância internacional de candidemia, que *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais frequentemente isoladas na América Latina, Canadá e Europa, e propuseram que a alta frequência de isolamento desta

espécie provavelmente seja devida ao manuseio inadequado de utilitários médicos e falhas nas medidas de controle de infecção hospitalar.

No Brasil, *C. parapsilosis* foi identificada como a principal causa de candidemia em pacientes pediátricos, com 38,5% dos casos (PASQUALOTTO et al. 2005). E Medrano et al. (2006) evidenciou a importância desta espécie em episódios de candidemia no nordeste brasileiro, uma vez que foi o principal patógeno isolado durante dois anos de pesquisa, apresentando ainda a segunda maior taxa de mortalidade.

Estudo sobre candidemias causadas por *C. parapsilosis* em hospitais brasileiros indicou como seus principais fatores de risco a neutropenia, o uso de catéteres venosos e a quimioterapia de combate ao câncer (BRITO et al., 2006). Sendo a colonização do trato gastrointestinal ou pele frequentemente o primeiro passo na patogênese de candidíase invasiva. Desta forma recém-nascidos são particularmente propensos a tais infecções, tendo em vista a sua integridade comprometida da pele, maior susceptibilidade a infecções do trato gastrointestinal, e necessidades de cateteres umbilicais e intubação traqueal prolongada (BENJAMIN et al., 2000). Além disso, em contraste com outras espécies não *albicans*, as taxas de mortalidade em neonatos de baixo peso causadas por *C. parapsilosis* são drasticamente superiores, por vezes, equivalentes às associada com *C. albicans* (TROFA et al., 2008).

Até recentemente, os isolados de *C. parapsilosis* eram divididos em três grupos genotípicos distintos, denominados grupos I, II e III (LEHMANN et al., 1992; LIN et al., 1995; ROY; MEYER, 1998). Posteriormente, no entanto, duas novas espécies, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, foram propostas para substituir as designações *C. parapsilosis* grupo II e III, respectivamente, sendo mantida a denominação *C. parapsilosis* para os isolados do grupo I (TAVANTI et al., 2005). A incidência de *C. metapsilosis* é extremamente rara em isolados clínicos, diferentemente de *C. orthopsilosis* que segundo Tavanti et al. (2007) é capaz de colonizar e causar infecções em diferentes regiões anatômicas.

3.3 RELAÇÃO *CANDIDA*-HOSPEDEIRO

A relação parasita-hospedeiro é produto do balanço entre a virulência do microrganismo e as defesas do hospedeiro. De modo que, tanto fatores locais como sistêmicos contribuem para a colonização e para a eventual invasão tecidual pelas diferentes espécies de

Candida. A multiplicação celular nos diferentes sítios de colonização é favorecida pelos diversos fatores predisponentes anteriormente citados. Desta forma, no que tange ao hospedeiro, a colonização prévia por *Candida* spp. e a posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em casos de presença de doenças imunossupressoras, diabetes mellitus, uso crônico de corticóides, entre outros, favorecem a infecção. Ainda, como importantes fatores que contribuem para o desenvolvimento de quadros infecciosos podemos citar o uso de antibióticos de amplo espectro, a estrogoterapia, o hábito de usar roupas muito justas ou de fibras sintéticas, além da dieta alimentar rica em açúcares (FERNANDES; MACHADO, 1996; NARDIN, 2000).

A utilização de antibióticos de amplo espectro pode favorecer tanto a colonização quanto a infecção por *Candida*, na medida em que estes podem suprimir a microbiota normal, diminuindo assim a competição por nutrientes, por receptores epiteliais utilizados para a adesão, bem como a produção de substâncias (bacteriocinas) capazes de inibir a germinação de micélios (ZIARRUSTA, 2002).

Frequentemente o desenvolvimento de infecções por *Candida* spp. está associado a situações de debilidade imunológica do hospedeiro. Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem ter influência tanto na manifestação, como na severidade das infecções fúngicas. Assim, a forma clínica da doença dependerá da resposta imune do paciente (ROMANI, 2004).

O sistema inato, de defesas antifúngicas dos mamíferos, é mediado por células, receptores celulares e fatores humorais. Fagócitos como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas possuem papel central nesta atividade. Ainda, células NK, linfócitos T e células não hematopoiéticas, como células endoteliais e epiteliais, também participam neste processo (ROMANI et al., 2002). Assim, a resposta imune de combate aos fungos apresenta dois mecanismos principais: ação antifúngica efetora levando a destruição do patógeno, uma resposta imediata às partículas fúngicas ingeridas, e secreção de mediadores pró-inflamatórios, influenciando a resposta imune adaptativa (VILLAMÓN et al., 2004).

Estes mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados após a infecção. Tal ativação depende de um grupo de moléculas expressas constitutivamente pelo patógeno, que são reconhecidas por um grupo de receptores que fazem o reconhecimento de moléculas padrões e incluem os receptores de manose, receptores tipo “Toll” e receptores Dectina-1 (ROMANI, 2004, BROWN, 2006). Após as interações com as moléculas do patógeno, as células do sistema imune hospedeiro iniciam diversos mecanismos de defesa tais como a

produção de peptídeos antimicrobianos e a produção de citocinas e quimiocinas, levando ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória e resistência à infecção (AKIRA et al., 2006).

Receptores de manose reconhecem diversos tipos de carboidratos (manose, fucose, N-acetilglucosamina e glucose) presentes na superfície de microrganismos. Estes receptores são expressos principalmente por macrófagos e células dendríticas, sendo especialmente importantes na fagocitose de *C. albicans*. Promovem assim, a ligação entre as respostas imune inata e adaptativa. A fagocitose de células de *C. albicans* através destes receptores resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), degradação do fungo e estímulo de moléculas co-estimulatórias, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC II) e ativação de resposta celular protetora Th1 (YAMAMOTO et al., 1997).

As células dendríticas, localizadas nos tecidos, superfícies de mucosas e pele, são as primeiras a iniciar a resposta protetora contra *C. albicans* (NEWMAN; HOLLY, 2001). Tais células possuem a capacidade de internalizar diferentes tipos morfológicos fúngicos (tanto formas leveduriformes quanto filamentosas). A interação destas células e as células fúngicas, através de diferentes receptores, resultam em formas distintas de sinalização e conseqüentemente diferentes perfis de citocinas (ROMANI et al., 2002; ROMANI, 2004).

Neutrófilos também desempenham um papel importante na prevenção de doenças fúngicas em hospedeiro vertebrados (WALSH et al., 1990; FRADIN et al., 2005). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasivos. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima produzida por neutrófilos, catalisa reações do peróxido de hidrogênio com o íon cloro para produzir o ácido hipocloroso, que é utilizado pelos fagócitos para matar microrganismos (PHAM, 2006). Neutrófilos possuem ainda mecanismos microbicidas independentes de oxigênio. Estes mecanismos envolvem as enzimas lisossomais, que são muito importantes nos tecidos onde a concentração de oxigênio é baixa e a cadeia respiratória não pode funcionar efetivamente. Dentre as principais hidrolases lisossomais neste contexto, podemos citar as peroxidases como a lactoperoxidase (TAYLOR et al., 2005).

A ação anti-fúngica pelas células efectoras incluem morte e inibição do crescimento fúngico. Em geral as células fagocíticas possuem atividade antifúngica intrínseca que pode ser potencializada por opsoninas (anticorpos, C3b, iC3b) ou citocinas derivadas de células T, o que indica que as respostas imune inata e adaptativa são reciprocamente reguladas (ROMANI, 2002; HUFFNAGLE; DEEPE, 2003).

A citocina IFN- γ também apresenta papel central na resistência a infecções fúngicas, pois está relacionada à ativação das funções fungicidas de macrófagos, restabelecendo a resposta imune celular em indivíduos imunodeprimidos (VÁSQUEZ-TORRES e BALISH, 1997). Macrófagos e neutrófilos ativados por IFN- γ produzem interleucina 12 (IL-12), necessária para uma resposta celular eficiente (CENCI et al., 1998; KASHINO et al., 2000).

Assim também, o TNF- α desempenha papel relevante na defesa contra infecções por *C. albicans*. Esta citocina, produzida por macrófagos em resposta a infecções fúngicas, estimula a síntese de quimiocinas e moléculas de adesão por estes fagócitos (necessárias para o recrutamento de neutrófilos), além de estimular a atividade candidacida destas células (FILLER et al., 2005).

A citocina TNF- α esta relacionada também com a indução da expressão de outras moléculas envolvidas na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans*. Entre estas incluem-se as moléculas de adesão E-selectinas e VCAM-1, IL-8 e fator ativador de plaquetas (PAF) relacionadas à adesão e ao recrutamento de leucócitos (FILLER et al., 2005, OROZCO et al., 2000).

3.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogenicidade de um micro-organismo é definida como sendo a capacidade desse de causar doença (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990). Os micro-organismos patogênicos desenvolveram uma série de mecanismos que favoreceram a colonização e a infecção do hospedeiro. Assim, a maioria dos patógenos, incluindo *Candida* spp., expressam uma série de fatores de virulência e apresentam estratégias específicas que os auxiliam na habilidade de colonizar tecidos hospedeiros, sobrepujar suas defesas e causar infecções (NAGLIK et al., 2003). Contudo, segundo Casadevall; Pirofski (2001), a virulência não pode ser considerada como uma característica isolada do micro-organismo, mas sim um processo dinâmico e com fenômenos de troca que incluem tanto o hospedeiro como os fatores microbianos.

A patogenicidade de um micro-organismo é definida como sendo a sua capacidade de causar doença (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990). Segundo Casadevall; Pirofski (2001) a virulência não pode ser considerada como uma característica isolada do

micro-organismo, mas sim um processo dinâmico e com fenômenos de troca que incluem tanto o hospedeiro como os fatores microbianos.

Assim, dentre os principais fatores que influenciam a etiologia de uma doença, está o estado fisiológico do hospedeiro, sendo este inclusive, o primeiro fator a influenciar as infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, contribuindo também para o desencadeamento de um extenso repertório gênico de determinantes de virulência expressos seletivamente 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; NAGLIK, 2001; KANTARCIOGLU; 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 (formação de hifas, pseudo-hifas e variações fenotípicas), formação de biofilme, produção de endotoxinas de baixo e alto peso molecular, bem como a expressão de fatores localizados na parede celular que facilitam a adesão e penetração através do tecido infectado. (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990; CALDERONE; BRAUN, 1991; SOLL, 1992; CHAFFIN et al., 1998; GHANNOUM, 2000; HAYNES, 2001; HUBE; NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003; TAVANTI et al., 2004; HUBE, 2004, 2009; SCHALLER et al., 2005; GOKCE et al., 2007; SHINOBU et al., 2007; NAGLIK et al., 2008).

A patogênese em candidíases tem sido associada com a regulação diferencial e temporal da expressão de diversos genes que codificam para os fatores de virulência acima citados, especialmente, aqueles envolvidos no dimorfismo, aderência, invasão e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (STAIB et al., 2000).

Contudo, a maioria dos estudos relacionados a caracterização destes 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, de necessidades nutricionais e fisiológicas 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; 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 pouquíssimos estudos (MANNS et al., 1994; LUO et al., 2001; MALCOK et al., 2009; NEGRI et al., 2010; FAVERO et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Neste contexto, espécies como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* possuem papel de destaque, considerando diversos fatores como: suas acentuadas taxas de incidência, ao fato de suas detecções estarem frequentemente associadas com o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas, a recente emergência e existência de poucos estudos relacionados aos fatores de virulência das duas espécies não-*albicans*, bem como a resistência intrínseca que estas últimas apresentam aos anti-micóticos comumente empregados no controle de candidíases.

3.5 FATOR HEMOLÍTICO

O ferro elementar é um cofator necessário para uma ampla variedade de funções metabólicas, tais como, transporte de oxigênio, respiração, regulação da expressão gênica e síntese de DNA, sendo desta forma, essencial para a sobrevivência de todos os organismos. Contudo, devido a sua reatividade com peróxido de hidrogênio, que acaba por resultar na formação de radicais hidroxila altamente tóxicos, que podem reagir com açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, bases nitrogenadas e ácidos orgânicos presentes nas células, os organismos necessitam apresentar um sistema regulado de captação e armazenamento deste elemento (BYERS; ARCENEUX, 1998; MOYE-ROWLEY, 2003).

Desta forma, a habilidade de micro-organismos patogênicos em adquirir ferro elementar é de fundamental importância para a sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecções em seus hospedeiros, e a disponibilidade de ferro apresenta assim um importante papel na relação patógeno-hospedeiro, bem como na virulência de bactérias e fungos (PAYNE, 1993; HOWARD, 1999).

Em humanos, a maioria do ferro está localizada intracelularmente, na forma de ferritina, proteínas Fe-S, 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 (soro) e lactoferrina (secreções corporais) respectivamente (MANNS et al., 1994; WEINBERG, 1999a; RATLEDGE; DOVER, 2000).

A indisponibilidade deste elemento, através da retenção do ferro em proteínas do hospedeiro, atua como um obstáculo a infecções, ao manter a concentração de ferro livre nos fluidos corporais em níveis insuficientes para o crescimento microbiano. Esta estratégia de defesa é conhecida como “imunidade nutricional” (WEINBERG, 1999a; RATLEDGE; DOVER, 2000). Por outro lado, micro-organismos patogênicos apresentam estratégias complexas para aquisição deste elemento e em muitos destes, a disponibilidade de ferro atua como um sinal para induzir a expressão de determinantes de virulência (HOWARD, 1999; WEIBERG, 1999b; TIMM et al., 2003).

Assim, uma vez que o Ferro não é encontrado na forma livre, e tendo em vista sua essencialidade, muitos patógenos adquirem-no 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 o que o capacita a extrair o ferro elementar. (MANNS et al., 1994; WATANABE et al., 1997; LUO et al., 2001, LUO et al., 2004). Para tal, alguns micro-organismos patogênicos secretam fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina ou o grupo prostético heme como fontes de ferro (BELANGER et al., 1995; LEWIS; DYER, 1995; WATANABE et al., 1999).

Atualmente, ainda 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 concentra-se em *C. albicans*, havendo escassez de informações sobre o tema entre as demais espécies de gênero.

C. albicans apresenta três mecanismos independentes para captação de ferro a partir de sideróforos, quelantes férricos variados e o grupo heme (HAMMACOTT, 2000; HEYMANN, 2002; HU, 2002; KNIGHT, 2002; SANTOS et al., 2003; PENDRAK, 2004; WEISSMAN; KORNITZER, 2004; ALMEIDA et al., 2009). Estes mecanismos auxiliam-na a adaptar-se ao ambiente, no que se refere à variabilidade nas formas e na disponibilidade de ferro.

Sideróforos são pequenas moléculas, sintetizadas e secretadas por uma grande variedade de micro-organismos, as quais ligam-se solubilizam íons ferro com elevada afinidade. Embora *C. albicans* aparentemente não possua a maquinaria enzimática necessária para sintetizar e secretar tais moléculas, ela é capaz de capturar ferro de sideróforos secretados por outros micro-organismos (HU, 2002; LAN et al., 2004).

Já, para capturar o ferro presente em quelantes férricos, como a transferrina, *C. albicans* utiliza um sistema de captação redutivo, localizado em sua membrana plasmática. Tal sistema também é empregado para a captação do ferro da ferritina e de fontes ambientais (HAMMACOTT et al., 2000; KNIGHT et al., 2002; SANTOS et al., 2003; WEISSMAN; KORNITZER, 2004; ALMEIDA et al., 2008).

Conforme descrito por Manns et al (1994), para a utilização do ferro presente no grupo heme, *C. albicans* produz um fator hemolítico, o qual provoca a lise dos eritrócitos e a consequente liberação da hemoglobina que contém este grupo prostético (MANNNS et al., 1994; WATANABE et al., 1999; LUO et al., 2001). Assim, a hemoglobina apresenta-se como uma importante fonte de ferro, sendo que a produção de fator hemolítico veio a ser posteriormente considerada um importante atributo de virulência também para as demais espécies deste gênero (WATANABE et al., 1997; LUO et al., 2001).

Desta forma, conforme descrito por Pendrak et al. (2004) *C. albicans* é capaz de ligar-se especificamente à hemoglobina, com consequente produção de heme-oxigenase, que por sua vez é capaz de retirar o ferro do grupo 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.

Muito embora a hemólise promovida por *C. albicans* tenha sido descrita por Manns et al. em 1994, a secreção do fator hemolítico nesta espécie só foi reportada posteriormente por Watanabe et al. em 1999.

Luo et al. (2001) reportaram a atividade hemolítica de diversas espécies do gênero *Candida*. Neste estudo a promoção de dois tipos distintos de hemólise foi observada em meio solidificado 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*.

Posteriormente, diversos outros estudos também demonstraram, em ensaios semelhantes, a atividade hemolítica variável em um amplo espectro de espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans* e *C. tropicalis* (FURLANETO-MAIA et al., 2008; YIGIT; AKTAS,

2009; FRANÇA et al., 2010a; ŞEKER, 2010). E, muito embora a evidenciação de hemólise por isolados de *C. parapsilosis* venha se mostrando ser altamente variável, recentemente por meio de modificações nos ensaios comumente empregados, alguns estudos também evidenciaram a capacidade hemolítica nesta espécie (MALCOK et al., 2009; RÖRIG et al., 2009; FRANÇA et al., 2010b).

De modo geral, o fenômeno de hemólise tem sido descrito como fortemente influenciado por condições de cultivo (YIGIT; AKTAS, 2009), dentre as quais a composição química do meio, especialmente a concentração de glicose, parece ser um dos principais moduladores (MANNNS et al., 1994; SHUSTER et al., 2004; TSANG et al., 2007; MALCOK et al., 2009). Malcok et al. (2009), em um estudo que avaliaram a promoção de hemólise por espécies do gênero *Candida* frente a adição de glicose em meio Sabouraud dextrose líquido, além de verificar que isolados de *C. parapsilosis* que não eram capazes de promover hemólise quando cultivadas sem a adição de glicose suplementar, passaram a promovê-la, quando de tal suplementação. Também verificou que as demais espécies de *Candida*, inclusive *C. albicans* e *C. tropicalis*, passaram a promover hemólise em níveis significativamente superiores frente à suplementação com glicose. De modo similar, Favero et al. (2011) também demonstraram que a produção do fator hemolítico por *C. tropicalis* pode ser regulada por determinadas condições de cultivo, ao encontrar que a hemólise promovida por esta espécie ocorre de uma maneira glicose dependente. Também demonstraram, pela primeira, a liberação do fator hemolítico para o sobrenadante de cultivo por *C. tropicalis*.

Lachke et al. (2000) amplificaram e clonaram uma sequencia parcial de DNA de *C. glabrata* similar à de genes relacionados a hemolisinas de uma diversidade de organismos, variando em complexidade de bactérias à nematóides. Tal sequencia foi reconhecida como um possível gene que confere atividade hemolítica, sendo então denominada de gene *HLP* – “*hemolysin-like protein*”. Esta sequencia foi posteriormente utilizada por Luo et al. (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 para a correlação de tal expressão com a produção de hemolisinas *in vitro*, evidenciando assim o possível papel deste gene na atividade hemolítica dos isolados testados.

Watanabe et al. (1997) reportaram em *C. albicans* que o fator hemolítico é secretado para o meio, causando a liberação de hemoglobinas, e ainda sugeriram diferenças na utilização destas hemoglobinas entre células hifais e leveduriformes. 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 et al. (1999) caracterizaram o fator hemolítico produzido por *C. albicans* como uma manoproteína derivada de sua parede celular, e que a atividade hemolítica está associada com uma fração de aproximadamente 200kDa rica em açúcar. Tais autores demonstraram que esta manoproteína atua em uma proteína presente na membrana dos eritrócitos que catalisa a troca de ânions, denominada Banda 3. Especificamente, foi sugerido que a manana liga-se à proteína Banda 3 da membrana 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.

3.6 PAREDE CELULAR

A parede celular de *Candida* spp. é uma estrutura de grande importância, pois além de ser o ponto inicial de contato entre a célula e seu ambiente, contribuindo para interações entre o fungo e seu hospedeiro, também determina a forma da célula fúngica, levedura ou hifa, além de carregar importantes antígenos e ser responsável pela aderência aos diferentes substratos (PITARCH et al., 2002; RUIZ-HERRERA et al., 2006; CHAFFIN, 2008). Como a conversão morfológica a partir de levedura para a forma filamentosa requer remodelação da parede celular, o que envolve alterações na sua composição e organização, a parede é na verdade uma estrutura plástica e dinâmica, que está em constante mudança em resposta aos sinais ambientais e aos diferentes estágios do ciclo celular (CHAFFIN et al., 1998; PITARCH et al., 2002).

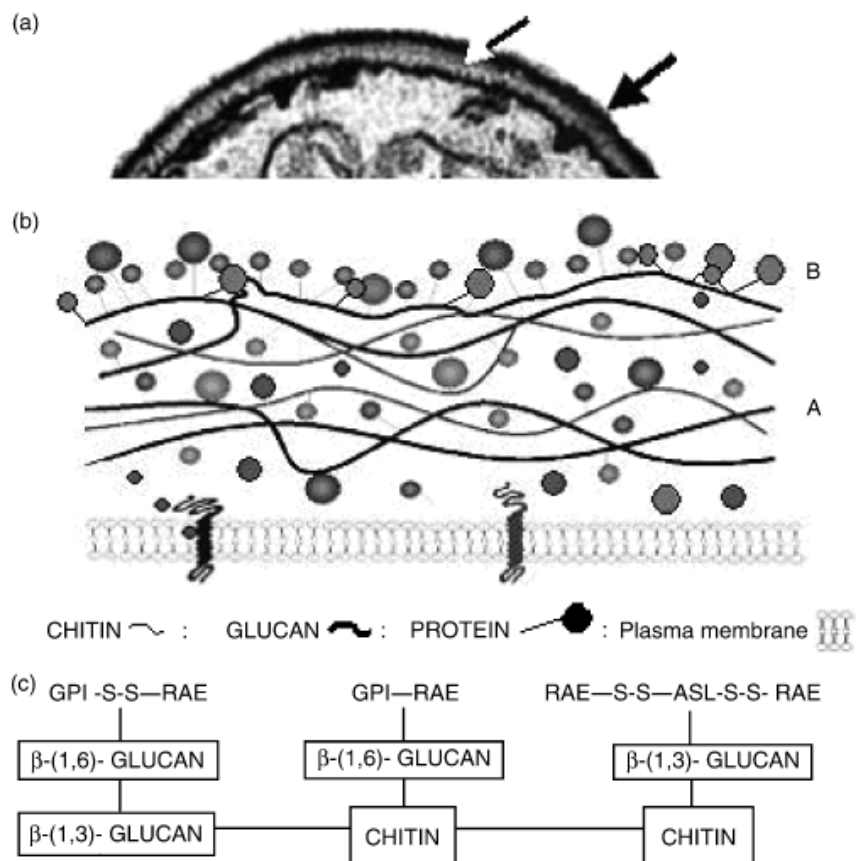
Ainda, a presença de proteínas específicas na parede celular também confere à célula algumas de suas funções essenciais, tais como: resistência a agentes desestabilizadores, aderência às superfícies – incluindo ao hospedeiro e às outras células microbianas –, a porosidade necessária ao fluxo de algumas substâncias, bem como funções enzimáticas como a proteólise (CHATTAWAY et al., 1974; ZLOTNIK et al., 1984; CHAFFIN et al., 1998; CHAFFIN, 2008).

Notadamente, algumas enzimas de parede desempenham papel na degradação de grandes moléculas impermeáveis, tornando os produtos acessíveis para a nutrição da célula; outras estão envolvidas na degradação de polímeros da própria parede celular ou em sua síntese. Assim, várias enzimas degradativas têm sido localizadas na parede de *C. albicans* (CHAFFIN et al., 1998; PEDREÑO et al., 2004; RUIZ-HERRERA et al.,

2006). Além disso, um grande número de proteínas GPI (GPI: glicosil fosfatidil inositol) exibem atividades enzimáticas relacionadas à síntese e modulação de componentes da parede (quitinases, glucanases, etc.) (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Estruturalmente, a parede celular de leveduras como as do gênero *Candida* é organizada em camadas que são derivadas das abundâncias diferenciais de seus componentes. A camada interna, rica quitina e matriz polissacarídica, é menos elétron-densa do que as camadas externas, que são ricas em manoproteínas, conforme pode ser observado na Figura 1 (RUIZ-HERRERA et al., 2006; CHAFFIN, 2008). Tais camadas são formadas por apenas quatro classes principais de macromoléculas: proteínas de parede celular (CWPs – cell wall proteins), β -1,6-glicanas (polímeros de glicose com ligações β -1,6), β -1,3-glicanas (polímeros de glicose com ligações β -1,3), e quitina (polímeros de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) com ligações β -1,4) (KAPTEYN et al., 1999; CHAFFIN, 2008). Existe ainda uma pequena porção de lipídeos (1 a 7%) (CALDERONE; BRAUN, 1991; CHAFFIN et al., 1998; CABIB et al., 2001).

Figura 1 – Estrutura e representação esquemática da arquitetura da parede celular de *C. albicans*. (a) micrografia eletrônica de uma secção celular média. A camada interior elétron-transparente da parede celular (seta fina branca e preta) é composta principalmente de polissacarídeos (β -glucanas e quitina) e pequena quantidade de proteínas. A camada exterior elétron-densa (seta preta e espessa) é construída na sua maior parte por diferentes tipos de manoproteínas. (b) Esquema da parede celular. Cadeias de β -1,3 / β -1,6 - glicanas são ligadas por ligações covalentes à microfibrilas de quitina e, juntamente com algumas proteínas, dão origem a um componente básico (A). A superfície exterior do componente (B) é enriquecida com diferentes tipos de proteínas que estão ancoradas tanto por ligações não covalentes como por uma variedade de ligações covalentes. (c) Representação esquemática da organização molecular da parede celular. Proteínas da parede celular estão ligadas principalmente à cadeias curtas de β -1,6-glicanas, à quitina via 1,6-glicanas, ou diretamente à quitina. GPI: proteínas glicosil fosfatidilinositol; ASL: proteínas ligadas através de ligações alcali-sensíveis; RAE, proteínas ligadas por pontes dissulfeto. (Adaptado de RUIZ-HERRERA et al., 2006).



As proteínas de parede celular (CWPs) são, tipicamente, manoproteínas (polímeros de manose (manana) em associação covalente com proteínas (glico[mano]proteínas) que formam fibrilas prolongando-se radialmente para o exterior da

superfície celular. Elas correspondem a aproximadamente 30 a 50% do peso seco da parede, e durante seu transporte através da via secretora, algumas CWPs recebem uma âncora GPI (GPI: glicosil fosfatidil inositol) (KAPTEYN et al., 1999; RUIZ-HERRERA et al., 2006).

As β -1,6-glicanas são moléculas relativamente pequenas, consistindo de aproximadamente 140 resíduos de glicose, e representam apenas cerca de 5% do peso seco da parede (KAPTEYN et al., 1999).

Por sua vez, as β -1,3-glicanas são moléculas maiores, predominantemente lineares, consistindo de cerca de 1500 resíduos de glicose. São os principais componentes estruturais da parede celular, e juntamente com a quitina são responsáveis pela rigidez da parede, determinando assim sua forma. Frequentemente, mais de 50% da parede celular é formada por β -1,3-glicanas (KAPTEYN et al., 1999).

Já as moléculas de quitina respondem por apenas 1 a 2% da parede celular de leveduras. Parte da quitina está localizada em um anel na base do botamento, embora alguma quitina também esteja depositada, de uma forma dispersa, na lateral da parede (KAPTEYN et al., 1999).

3.7 PROTEÍNAS DE PAREDE CELULAR (CWPs)

A identificação de proteínas de parede celular (CWPs) tem avançado rapidamente graças a introdução e desenvolvimento de três novas abordagens metodológicas: o sequenciamento do genoma completo de fungos, a análise *in silico* dos genomas com o auxílio programas e algoritmos computacionais e técnicas de análise proteômica extremamente sensíveis. Tais análises têm permitido a identificação de centenas de ORFs codificantes de prováveis CWPs, especialmente em *C. albicans*, que por sua tradicional importância, é usualmente escolhida como modelo (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Tais proteínas de parede celular (CWPs) têm sido classificadas de diferentes formas, embora de modo geral, o método de extração (reflexo dos tipos de ligação e dos ligantes) e a presença de um motivo de carboidrato (glicoproteínas, “verdadeiras” CWPs) ou não (proteínas de parede “não típicas”) representem a base da maioria das classificações (RUIZ-HERRERA et al., 2006). Especificamente, segundo Ruiz-Herrera et al. (2006) a definição de proteínas de parede celular genuínas inclui apenas aquelas proteínas que possuem um motivo de secreção, são N- e/ou O-glicosiladas, e possuem outras características, como um motivo de ligação GPI ou repetições internas específicas.

Uma funcional organização das “verdadeiras” CWP’s divide-as em duas principais classes: proteínas GPI (GPI-CWP’s), que são aquelas ligadas às β -1,6-glicanas através do motivo GPI, e proteínas PIR, proteínas com repetições internas (PIR: proteins with internal repeats), caracterizadas por conter sequências repetitivas e ser altamente O-glicosiladas (KAPTEYN et al., 1999). Um terceiro grupo formado por manoproteínas retidas na parede celular através de pontes dissulfeto também tem sido incluído, mais recentemente, entre as CWP’s verdadeiras (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Os genes de GPI-CWP’s codificam para proteínas ricas em serina e treonina, com um peptídeo sinal na extremidade N-terminal. Frequentemente contêm sequências com repetições internas e terminam em uma sequência hidrofóbica a qual é substituída por uma âncora GPI no retículo endoplasmático. GPI-CWP’s são ligadas aos demais componentes da parede celular através de resíduos livres desta âncora GPI (KAPTEYN et al., 1999). Em *C. albicans* proteínas GPI representam, quantitativamente, a classe mais importante de proteínas de parede celular, correspondendo por cerca de 88% de todas as proteínas covalentemente ligadas à parede (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Como citado anteriormente, análises recentes têm revelado a presença de um grande número de proteínas GPI em espécies de *Candida*, sendo atribuídas funções como adesão, hidrolases, e outras diferentes atividades enzimáticas, além de funções estruturais (RUIZ-HERRERA et al., 2006). Contudo, muitas destas proteínas preditas ainda não possuem funções conhecidas.

Genes PIR codificam para uma família de proteínas que compartilham as seguintes características: um peptídeo sinal na extremidade N-terminal, um sítio de reconhecimento à proteinase Kex2p (uma enzima envolvida na ativação de ferormônios secretados – “*a*-mating factor”) (NEWPORT, G.; AGABIAN, 1997) e uma ou mais repetições internas. Elas não contêm a sequência de adição à âncora GPI na extremidade C-terminal. Kandasamy et al. (2000) demonstrou a existência de certo grau de conservação nas Proteínas PIR em fungos, bem como, que algumas proteínas PIR também são secretadas para o meio de cultivo (KANDASAMY et al., 2000; RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Ruiz-Herrera et al. (2006) em sua revisão também descrevem um grupo atípico de proteínas de parede celular em *C. albicans*, que são desprovidas de um motivo de carboidrato e são retidas na parede por mecanismos desconhecidos. Segundo os autores, estas proteínas devem ser distinguidas das proteínas típicas de parede celular, porquanto estas são altamente glicosiladas, contêm um peptídeo sinal e são secretadas através das vias normais para o meio, embora fiquem retidas na parede em proporções variáveis onde apresentam

funções diversas. Já as proteínas típicas de parede celular, são proteínas que se têm demonstrado como sendo de origem citoplasmática e não possuem as características de uma típica proteína secretada.

Estas proteínas têm sido recentemente detectadas em quantidades significativas também na parede celular, embora ainda não se tenha claro se são acidentalmente presas à parede, ou se de alguma forma são ativamente liberadas e associadas aos polímeros da parede celular (RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Assim, tendo em vista a importância e a grande complexidade estrutural e funcional da parede celular de fungos, conforme descrito por Nimrichter et al (2005), o conjunto de características decorrentes de sua composição e a biossíntese destes componentes podem ser considerados como importantes alvos potenciais para drogas e anticorpos antifúngicos.

Desta forma, estudos relacionados à identificação e expressão de componentes da parede celular podem contribuir para o conhecimento do seu papel na patogênese fúngica (ex.: expressão de adesinas e receptores para proteínas do hospedeiro; atividade proteolítica extracelular; hidrofobicidade) (BORG; RUCHEL, 1988; DOUGLAS, 1987; HAZEN, 1989), na interação parasito-hospedeiro (LOPEZ-RIBOT et al., 1991), bem como indicar sítios moleculares alvo promissores para a pesquisa de novas drogas antifúngicas específicas (GROLL et al., 1998; PITARCH et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, p.783-801, 2006.
- AKPAN, A.; MORGAN, R.; Oral candidiasis. **Postgraduate Medicine Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.
- ALMEIDA, R.S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1000-1012, 2009.
- 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.
- 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.
- BELANGER, M., BEGIN, C.; JACQUES, M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 656-662. 1995.
- BENJAMIN, D. K.; ROSS, K.; MCKINNEY, R. E.; BENJAMIN, D. K.; AUTEN, R.; FISHER, R. G.; When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. **Pediatrics**. v. 106, p. 712–718, 2000.
- BONASSOLI, I.A.; BERTOLI, M.; SVINDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 159-162, 2005.
- BORG, M. ; RÜCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 626-631, 1988.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 87-91, 2008.
- 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.

BRITO, L. R.; GUIMARAES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, P. L.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, p. 261–266, 2006.

BROWN, G.D. Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v.6, n.1, p.33-43, 2006.

BRUDER-NASCIMENTO, A; CAMARGO, C.H.; SUGIZAKI, M.F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, C.A.; MONDELLI, A.L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, doi:10.1186/1756-0500-3-1, 2010.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A. S; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C. A.; RHEINBAY, E.; GRABHERR, M.; FORCHE, A. REEDY, J. L.; AGRAFIOTI, I.; ARNAUD, M. B.; BATES, S.; BROWN, A. J. P.; BRUNKE, S.; COSTANZO, M. C.; FITZPATRICK, D. A.; DE GROOT, P. W. J.; HARRIS, D.; HOYER, L. L.; HUBE, B.; KLIS, F. M.; KODIRA, C.; LENNARD, N.; LOGUE, M. E.; MARTIN, R.; NEIMAN, A. M.; NIKOLAOU, E.; QUAIL, M. A.; QUINN, J.; SANTOS, M. C.; SCHMITZBERGER, F. F.; SHERLOCK, G.; SHAH, P.; SILVERSTEIN, Q. A. T.; SKRZYPEK, M. S.; SOLL, D.; STAGGS, R.; STANSFIELD, I.; STUMPF, M. P. H.; SUDBERY, P. E.; SRIKANTHA, T.; ZENG, Q.; BERMAN, J.; BERRIMAN, M.; HEITMAN, J.; GOW, N. A. R.; LORENZ, M. A.; BIRREN, B. W.; KELLIS, M.; CUOMO, C. A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p. 657-662, 2009.

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

CABIB, E.; ROH, D. H.; SCHMIDT, M. et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19679-82, 2001.

CALDERONE R. A. Introduction and historical perspectives. **Candida and Candidiasis**, ASM Press, Washington, DC. p. 15–25, 2002.

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

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

CASADEVALL, A. ; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 337-44, 2001.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; FÉ D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; KOPF, M.; ROMANI, L. IFN- γ is required for IL-12 responsiveness in mice with *Candida albicans*. **The Journal of Immunology**, v.161, p.3543-3550, 1998.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, p. 495-544, 2008.

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

CHAI, Y. A. L.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**. V. 36, p. 282-298, 2010.

CHATTAWAY, F. W., S. SHENOLIKAR, AND A. J. E. BARLOW. Release of acid phosphatase and polysaccharide- and protein-containing components from surface of dimorphic forms of *Candida albicans* by treatment with dithiothreitol. **Journal of General Microbiology**, v. 83, p. 423–426, 1974.

CHEN, S. C. A.; MARRIOTT, D.; PLAYFORD, E. G.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C.; SLAVIN, M. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 662-669, 2009.

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. e GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36 p.599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: a clinical and therapeutic approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 332-337, 2007.

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.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized doubleblind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 470–474, 2003.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, A. G. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 365–374, 2008.

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 BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLÀN, R.; PONTÒN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, 3481-3486, 1999.

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.

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.

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.

DOUGLAS, L. J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 27-43, 1987.

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

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infection Disease**, 2010, doi:10.1016/j.ijid.2010.04.006.

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

FAVERO, 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.

FERNANDES, C. E.; MACHADO, R.B. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. *Rev Bras Med*, v. 7, p. 100-4, 1996.

FIDEL J.R, 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.

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

FILLER, S.G.; YEAMAN, M.R.; SHEPPARD, D.C. Tumor Necrosis Factor Inhibition and Invasive Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p.208–212, 2005.

FITZPATRICK, D. A.; LOGUE, M. E.; STAJICH, J. E.; BUTLER, G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 99, 2006.

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

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

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

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. B. M.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, 2010b, doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x.

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

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

GHANNOUM, M.; ABU-ELTEEN, K. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 265-82, 1990.

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. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v.144, p. 829-838, 1998.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p.265-269, 2007.

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

GONZALEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2902–2905, 2008.

GROLL, A. H., DE LUCCA, A. J., AND WALSH, T. J. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 117–124, 1998.

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.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p. 181-195, 2011.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTONSKAGGS, 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.

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

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

HAZEN, B. W.; HAZEN, K. C. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2521-25, 1988.

HEYMANN, P.; GERADS, M.; SCHALLER, M.; DROMER, F.; WINKELMANN, G.; ERNST J.F. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5246–5255, 2002.

HINRICHSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

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

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

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

HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 347-349, 2009.

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

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE JR, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, n.4, p.344-350, 2003.

KANDASAMY, R.; VEDIYAPPAN, G.; CHAFFIN, W. L. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, p. 239–243, 2000.

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.

KAPTEYN, J. C.; HOYER, L. L.; HECHT, J. E.; MÜLLER, W. H.; ANDEL, A.; VERKLEIJ, A. J.; MAKAROW, M.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 601-611, 2000.

KASHINO, S.S., FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L.G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential TH1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- α production. **J. Interf. Cyt. Res.**, v.20, n.1, p.89-97, 2000.

KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, p. 14–18, 2000.

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

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.

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

KOSSOFF, E. H.; BUESCHER, E. S.; KARLOWICZ, M. G. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 17, p. 504–508, 1998.

KRCMERY, V. Candidemia in cancer patients: risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. **Acta Chemotherapeutica**, v. 5, p. 133–145, 1999b.

KRCMERY, V. *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 1–6, 1999a.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, p.878-888, 2002.

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

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

LARONE, D. Medically Important Fungi; A Guide to Identification. 4th edn. **ASM Press**, Washington, 2002.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, p. 197-205, 2009.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.M.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3249–3254,1992.

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. **Journal of Bacteriology**, v.177, p. 1299-1306, 1995.

LIGUORI, G.; ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**. v. 24, p. 76–78, 2009.

LIN, D.M.; WU, L.C.; RINALDI, M.G.; LEHMANN, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.1815–1821, 1995.

LOPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; MARTINEZ, J. P. et al. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2324-32, 1991.

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.

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

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

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A.; PIGNATARI, A.C.C. *et al.* and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866–1871, 2011.

MÉAN M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12:204, 2008. (doi:10.1186/cc6212).

MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO RDE, A.; ROCHA, M.F.; RABENHORST, S.H.; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MESSER, S. A.; JONES, R. N.; FRITSCH, T. R. International Surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (5), p. 1782-1787, 2006.

MIRANDA, L. N.; VAN DER HEIJDEN, I. M.; COSTA, S. F.; SOUSA, A. P.; SIENRA, R. A.; GOBARA, S.; SANTOS, C. R.; LOBO, R. D.; PESSOA, V. P.; LEVIN, A. S. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infection**. v.72, p. 9–16, 2009.

MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; 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.

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

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

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.R.; RODGERS, C.A.; WOODMAN, A.J.; CHALLACOMBE, S.J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, p. 3266–3280, 2008.

NARDIN, M.E. *et al.* Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relación con algunos factores de riesgo. **Revista Argentina de Microbiología**, 2000.

NEGRI, M.; GONÇALVES, V.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. **British Journal of Biomedical Science**, v. 67, p. 120-125, 2010.

NEWMAN, S.L. & HOLLY, A. *Candida albicans* Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. **Infection and Immunity**, v.69, n.11, p.6813-6822, 2001.

NEWPORT, G.; AGABIAN, N. KEX2 Influences *Candida albicans* Proteinase Secretion and Hyphal Formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v 272, p. 28954-28961, 1997.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G. *et al.* The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 789-98, 2005.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, p. 561-570, 2010.

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

OLIVEIRA, R. D.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ, R. Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 231-235, 2001.

OROZCO, A.S.; ZHOU, X.; FILLER, S.G. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infection and Immunity**, v.68, p.1134-1141, 2000.

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 (5), p. 634-643, 2003.

PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia. **Mycopathologia**, v. 160, p. 111-116, 2005.

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.

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

PEDREÑO, Y.; MAICAS, S.; ARGUELLES, J. C.; SENTANDREU, R.; VALENTIN, E. The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 40852–40860, 2004.

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.

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

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species reservoirs and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p. 89-94, 1996.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3254–3259, 2001.

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. **Journal of Clinical Microbiology** v.42, p.3142–3146, 2004.

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, 2006a.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, A. S.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 278–283, 2010.

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.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; BOYKEN, L. TENDOLKAR, S.; KROEGER, J. DIEKEMA, D. J. Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3185-3190, 2009.

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

PFALLER, M. A; PAPPAS, P.G.; WING, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 3-14, 2006b

PFALLER, M.; DIEKEMA, D.J.; International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 11–23, 2004.

PFALLER, M.A, JONES, R.N., MESSER, S.A., EDMOND, M.B., WENZEL, R.P. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, p. 327–332, 1998

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

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NG, K.P.; COLOMBO, A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 842-849, 2008.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.852–856, 2002b.

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.; 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.

PHAM, C.T.N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature**, v.6, p.541-550, 2006.

PITARCH, A.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Sequential Fractionation and Two-dimensional Gel Analysis Unravels the Complexity of the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Cell Wall Proteome. **Cellular Proteomics**, v. 1.12, p. 967-982, 2002.

PITTET, D.; 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.

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

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.

RHO, J.; SHIN, J.; SONG, J.; PARK, M.; KEE, S.; JANG, S.; PARK, Y.; SUH, S.; RYANG, D. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 80–86, 2004.

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

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, p. 2155–2162, 2005.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.1-23, 2004.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v.10, n.11, p.508-514, 2002.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 225-227, 2009.

ROY, B.; MEYER, S.A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.216–218, 1998.

RUHNKE, M.; MASCHMEYER, G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer – Review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 7, p. 227-235, 2002.

RUIZ-HERRERA, R.; ELORZA, M. V.; VALENTÍN, E.; SENTANDREU, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v.6, p. 14–29, 2006.

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 (2), p. 398-429, 2001.

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

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.

ŞEKER E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their *in vitro* hemolytic activity in Western Turkey. **Mycopathologia**, v. 169, p. 303-308, 2009.

SHIN, J.H., F.S. NOLTE, C.J. MORRISON. Rapid identification of *Candida* species in blood culture by a clinically useful polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1454–1459, 1997.

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.

SHORR, A. F.; TABAK, Y. P.; JOHANNES, R. S.; SUN, X.; SPALDING, J. KOLLEF, M. H. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v.13, doi: 10.1186/cc8110, 2009.

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

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

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

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.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p.7, 1991.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.; GHELARDI E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1455–1462, 2007.

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.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.901-944, 2005.

TIMM, J.; POST, F.A.; BEKKER, L.G.; WALTHER, G.B.; WAIN-WRIGHT, H.C.; MANGANELLI, R. Differential expression of iron, carbon and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 14321-14326, 2003.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21 (4), p. 606-625, 2008.

TSANG, C. S. P.; CHU, F. C. S.; LEUNG, W. K.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P.; SIU, S. C. Phospholipase, Proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated

from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1393-98, 2007.

VÁSQUEZ-TORRES, A. & BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.170-192, 1997.

VAN ASBECK, E.C.; HUANG, Y.C.; MARKHAM, A.N.; CLEMONS, K.; DAVID, A. Stevens *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v.164, p.287–293, 2007.

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.

VILLAMÓN, E.; GOZALBO, D.; ROIG, P.; O'CONNOR, J.E.; FERRANDIZ, M.L.; FRADELIZI, D.; GIL, M.L. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. **Microbes and Infection**, v. 6, n.6, p.542-548, 2004.

WALSH, T.J.; LEE, J.; AOKI, S.; MECHINAUD, F.; BACHER, J.; LECCIONES, J.; THOMAS, V.; RUBIN, M.; PIZZO, P.A. Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic host. **Reviews of Infectious Diseases**, v.12, n.3, p.307-S317, 1990.

WANG, L.; CHI, Z.; YUE, L.; CHI, Z. and ZHANG, D. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. **Journal of Ocean University of China (English Edition)**, v. 7, p. 416-420, 2008.

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.

WEINBERG, E.D. Iron loading and disease surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 346-352, 1999a.

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

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

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.

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

YAMAMOTO Y.; KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor response, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), MIP-2, and KC response, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophage. **Infection and Immunity**, v.65, p.1077-1082, 1997.

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

ZAUGG, C.; 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.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 22-4, 2002.

ZLOTNIK, H., M. P. FERNANDEZ, B. BOWERS, AND E. CABIB. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 1018–1026, 1984.

PARTE I

HEMOLYTIC FACTOR PRODUCTION IS VARIABLE AMONG *Candida* SPECIES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES

DANIEL FAVERO^{*}, LUCIANA FURLANETO-MAIA^{**}, EMANUELE J. G. FRANÇA^{*} & MARCIA C. FURLANETO^{***}

Short title: Hemolytic factor in *Candida* spp.

SUMMARY: Yeasts belonging to the genus *Candida* are responsible for the majority of fungal bloodstream infections. Most cases of these infections have been attributed to *C. albicans*, but recently, non-*albicans* species have been identified as common pathogens. Although hemolytic factor is known to be putative virulence factor contributing to pathogenicity in *Candida* species, its production still poor evaluated. The present study was undertaken to analyze the production of hemolytic factor by *C. albicans* (10), *C. tropicalis* (13) and *C. parapsilosis* (08) isolates associated with bloodstream infections. Data of hemolysis zones on plate assay revealed that the majority of *C. albicans* isolates produced mild hemolytic activity whereas the majority of *C. tropicalis* produced strong activity. On the other hand, none of the tested *C. parapsilosis* isolates exhibited hemolysis. We also analyzed the production of hemolytic factor released in the culture supernatant. Different degrees of hemolysis were promoted by *Candida* isolates, where *C. tropicalis* isolates exhibited the highest production of hemolytic factor ($P<0.05$) followed by *C. albicans* and *C. parapsilosis* isolates. Furthermore, there were no significant intra-species differences ($P>0.05$) in the hemolytic activity among *Candida* species isolates. To the best of our knowledge, this is the first report of species-specific differences in hemolytic factor production by *Candida* isolates associated with bloodstream infections. We have further showed for the first time the secretion of a hemolytic factor by isolates of *C. parapsilosis*.

Keywords *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, Candidemia, hemolytic factor

Introduction

Bloodstream infections (BSIs) caused by *Candida* spp. have increased in hospitalized patients and are associated with significant morbidity and mortality (Zaoutis et al., 2005;

* Department of Microbiology, Paraná State University at Londrina, Brazil

** Technological Federal University of Paraná, Brazil

*** Correspondence: Márcia C. Furlaneto. Department of Microbiology, Centre of Biological Sciences, Paraná State University at Londrina. C.P. 6001, CEP: 86051990. Londrina-PR, Brazil. Phone: ++ 55 43 33715736. E-mail furlaneto@uel.br

Pappas 2006; Holley et al., 2009) []. In Brazil, *Candida* spp. accounts for approximately 6% of all nosocomial BSIs, resulting in 68.6% crude mortality (Marra et al., 2011) [].

According to recent surveys, *Candida albicans* still the main cause of *Candida* BSIs, however, these reports have also indicated that its incidence is declining and the frequency of some non-*albicans* *Candida* species (NAC) is increasing as causative agents of BSIs. For instance, *C. parapsilosis* has now been the second or third most common cause of *Candida* BSIs worldwide, while, in some equatorial countries, *C. tropicalis* is the second most common *Candida* isolated from BSIs, behind *C. albicans* (Mokaddas et al., 2007; Caggiano et al., 2008; Anunnatsiri et al., 2009; Gomez et al., 2009; Aydin et al., 2011; Marra et al., 2011).

Various characteristics of *Candida* spp. have been purposed as factors that enable these organisms to cause disseminated infection in susceptible hosts (reviewed in Calderone and Fonzi, 2001; Trofa et al. 2008; Lim et al., 2012; Silva et al., 2012) [].

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 (Weinberg 1978; Bullen 1981) []. Hemolytic activity is known to be putative virulence factor contributing to disseminated candidal pathogenesis, particularly facilitating hyphal invasion (reviewed in Odds, 1988) []. The hemolytic factor secreted by *C. albicans* causes the release of hemoglobin, which is then used as an iron source by the organism (Manns et al., 1994; Watanabe et al. 1997) []. It has been proposed that hemoglobin is an important host factor for triggering a differentiation pathway necessary for establishing disseminated infections by *C. albicans* (Pendrak *et al.* 2004) []. We have recently demonstrated that a hemolytic factor is secreted from *C. tropicalis* cultures (Favero *et al.*, 2011) [] and that it is produced by different isolates independent of their clinical origin (França *et al.*, 2010; Favero *et al.*, 2011) [].

In the present work, we have demonstrated for the first time the secretion of hemolytic factor by *C. parapsilosis* isolates as well as a different pattern of hemolysis promoted by *C. albicans* and the common non-*albicans Candida* species, e.g., *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* associated with BSIs.

Materials and methods

Candida isolates and identification

Thirty-one *Candida* isolates were included in this study. The isolates were recovered from different patients with bloodstream infection who had been admitted to the intensive care unit of the Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU) (Furlaneto et al., 2011)[] and maintained in our laboratory stock collection. These included: *C. albicans* (n=10), *C. tropicalis* (n=13) and *C. parapsilosis* sensu stricto (n=08). The isolates obtained were presumptively identified onto CHROMagar® *Candida* agar (CA; CHROMagar, France) according to manufacture's. Identification was confirmed by PCR as described by França *et al.* (2010)[] using species-specific forward primers designed from the internal transcribed spacer regions (ITS2) as described by Li *et al.* []. Identity of *C. parapsilosis* sensu stricto (formerly *C. parapsilosis* group I) isolates was confirmed by the employment of primers for *URA3* gene (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) as described by Tavanti *et al.* [].

Hemolytic activity on plate assay

Hemolytic activity was evaluated as described by Favero *et al.* (2011) []. Briefly, isolates were precultured in RPMI 1640 liquid medium and incubated at 37°C for 18 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile water and a yeast suspension was prepared using hemocytometric counts. A 2 µl (2×10^5 cells) amount of this suspension was spot-inoculated on differential medium, a sugar-enriched sheep blood agar medium, which was

prepared by adding 7 ml of fresh sheep blood to 100 ml of RPMI agar supplemented with 3% glucose (w/v). The plates were incubated at 37°C for 48 h. The presence of a translucent and/or a greenish halo circumscribing the inoculum site, viewed with the aid of a white light transilluminator (UVP Bio Imaging Systems Dig Doc - It[®]; UPV, Inc, California, USA), indicated a positive hemolytic activity. The millimetric halo measurements were evaluated as (-) for none activity, (+) for weak activity (a halo zone < 1.0 mm around the colony), (++) for mild activity (a halo zone of 1.1-1.49 mm around the colony), and (+++) for strong activity (a halo zone ≥ 1.5 mm around the colony). The experiment was repeated three times, and the results represent mean values ± SD. In addition, one strain each of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus sanguis*, which induce beta and alpha hemolysis, respectively, were used as positive controls.

Preparation of red blood cells

Human RBCs (A type) were suspended in Ca²⁺- and Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS-) and centrifuged at 600 g for 7 min. The supernatant was removed, and the pelleted RBCs were further washed 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 hemolytic activity in the *Candida* culture supernatant.

Hemolytic activity from culture supernatant

Hemolytic activity in the culture supernatant was analyzed as described by Favero *et al.* (2011) [] by preculturing the isolates in RPMI 1640 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 48 h at 180 rpm. Following growth, cells were harvested by centrifugation at 1500 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 (1×10^8 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 hemolysis was calculated according to the equation: Hemolysis (%) = $100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_c) \times 100]$; where A_p , A_s and A_c are the absorbance of the positive control, test sample and negative control, respectively. The positive control was the RBCs lysed with SDS (0.6%), and the negative control was the RBCs suspension with RPMI plus PBS buffer at a 1:1 (v/v) ratio. Yeast growth was measured by colony-forming units (CFUs) counting. The assay was conducted in duplicate on three separate occasions for each isolate tested. Hemolytic activity was expressed as efficiency (hemolysis (%)/ 10^7 cells).

Statistical analysis

Tukey test was used to calculate the difference among hemolytic activity of *Candida* isolates. Kruskal-Wallis and *t*-test were used to calculate the difference among hemolytic activity on plate assay and in the culture supernatant, respectively, of *Candida* species using the statistical program SPSS Statistics 17.0. In all tests $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Hemolytic activity on plate assay

At 48 h postinoculation, on sheep blood medium, all *C. tropicalis* and *C. albicans* isolates showed an internal translucent ring, resembling beta-hemolysis (complete lysis of the erythrocytes), surrounding by a peripheral greenish-grey halo (partial lysis of the erythrocytes caused by the reduction of hemoglobin to methemoglobin). In contrast, no hemolysis was observed for *C. parapsilosis* isolates as illustrated in Figure 1.

In order to obtain semi-quantitative data of hemolysis, the hemolytic zone was measured and the results were expressed as arbitrary units (Table 1). Overall, the majority of *C. albicans* isolates produced mild activity (++), whereas the majority of *C. tropicalis* produced strong activity (+++). On the other hand, none of the tested *C. parapsilosis* isolates exhibited hemolysis (Table 1). Furthermore, there were no significant intra-species differences ($P>0.005$) in the hemolytic activity among *Candida* species isolates.

As shown in Figure 2, statistically significant difference was found between hemolytic activities of *Candida* species. The hemolysis promoted by isolates of *C. tropicalis* was higher than that promoted by isolates of *C. albicans*.

Hemolytic activity in the cell free broth

In this study, we also analyzed the production of hemolytic factor released in the culture supernatant by *Candida* isolates. As illustrated in Figure 3, different degrees of hemolysis were promoted by *Candida* isolates.

Regarding hemolytic activity from culture supernatants (Fig. 4), it can be highlighted that all *Candida* isolates produced hemolytic factor, including *C. parapsilosis* isolates. Similarly to found on plate assays, intra-species differences ($P>0.05$, Tukey test) were not observed. On the other hand, statistically significant differences in hemolytic activities were found among *Candida* species. *C. tropicalis* isolates exhibited highest production of hemolytic factor followed by *C. albicans* and *C. parapsilosis* isolates, while *C. parapsilosis* isolates exhibited the lowest production.

Discussion

Despite intensive research to identify virulence factors in pathogenic *Candida*, particularly in *C. albicans*, relatively little is known about the virulence attributes associated with non-

albicans Candida species. Additionally, studies on the production of hemolytic factor by *Candida* still scarce, particularly for non-*albicans Candida* species.

Manns *et al.* (1994) were the first to describe that *C. albicans* exhibits a hemolytic activity when grown on glucose-enriched blood agar. Similar approach was employed by Luo *et al.* (2001) to evaluate the hemolytic activity of non-*albicans Candida* species, including *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. The latter study revealed that 100% of *C. tropicalis* isolates produced hemolytic factor, while none of the *C. parapsilosis* isolates tested exhibited hemolytic activity.

Concerning non-*albicans Candida* species, we previously reported a correlation between hemolytic activity and the source of *Candida* isolates (França *et al.*, 2010) []. More recently we demonstrated that the hemolysis promoted by *C. tropicalis* is not influenced by a carbon dioxide increased atmosphere (5% CO₂), and that it occurs in a glucose-dependent manner (Favero *et al.*, 2011) []. Furthermore, we demonstrated for the first time that the hemolytic factor is secreted from cultures of *C. tropicalis* isolates obtained from distinct clinical sources (Favero *et al.*, 2011) [].

In this study we aimed to extend our knowledge about the production of hemolytic factor by *Candida* species. To this end, we analyzed possible a species-specific difference in hemolytic factor production by isolates associated with BSIs. We observed different profiles of hemolytic activity among *Candida* species. Based on both assays employed to determine the hemolytic activity (plate assay and cell free broth assay), the hemolysis promoted by isolates of *C. tropicalis* was higher than that promoted by isolates of *C. albicans* (Fig. 2 and 4). Interesting to note that intra-species differences in the hemolytic activity were not observed in neither of the assays used.

Currently, the analysis of hemolytic activity from *Candida* cell free culture broth has been reported for *C. albicans* (Watanabe *et al.*, 1999) [] and *C. tropicalis* (Favero *et al.*, 2011) [].

Differently, the studies about the production of hemolytic factor by *C. parapsilosis* are based on the hemolysis zones on plate assay (Luo et al., 2001; Bonassoli et al., 2005; Yigit and Aktas, 2009; França et al., 2010). According to these studies, the ability of *C. parapsilosis* to produce hemolytic factor is controversial. For instance, some studies revealed that this species is not producer of hemolytic factor (Luo et al., 2001; Yigit and Aktas, 2009) [], in contrast to that reported by other authors (Bonassoli et al., 2005; França et al., 2010) [].

Here, in contrast to the observed on plate assay (Table 1), all *C. parapsilosis* isolates exhibited a hemolytic activity from culture supernatants (Fig. 4). These findings suggest that other assays, then hemolytic plate assay, must be undertaken in order to evaluate hemolysis promotion by *C. parapsilosis* isolates. To the best of our knowledge, this is the first report of the secretion of a hemolytic factor by *C. parapsilosis* isolates. Under the conditions tested, *C. parapsilosis* exhibited the lowest production of a hemolytic factor compared to *C. tropicalis* and *C. albicans*.

Hemolytic activity may play an important role in bloodstream infection by *Candida*, where circulating erythrocytes are exposed directly to the yeast cells. The *C. albicans* hemolytic factor, a mannoprotein secreted by the cells, causes the release of hemoglobin by binding to human erythrocytes band 3 protein (Watanabe et al., 1997; Watanabe et al., 1999) []. According to these authors, although systemic hemolysis may not be caused by the mannoprotein, hemolysis around infected sites may enhance the fungal growth (Watanabe et al., 1999) [].

To date there are few reports comparing virulence factors exhibited by distinct *Candida* species isolated from blood (Kumar; Menon, 2006; Gokce et al., 2007; Hasan et al., 2009; Gultekin et al., 2011; Tay et al., 2011) []. For instance, the ability to form biofilm is variable among blood *Candida* species (Kumar and Menon, 2006; Hasan et al., 2009) [],

where *C. tropicalis* isolates exhibited the highest biofilm production followed by *C. parapsilosis* and *C. albicans* (Girish Kumar; Menon, (2006) []).

In conclusion, we report here for the first time that *Candida* spp obtained from blood cultures exhibit different profiles of in vitro hemolytic activities. In addition, our results suggest that for the analysis of hemolytic activity from *C. parapsilosis* isolates the employment of cell free broth assay is more appropriate than plate assay. Further studies should be undertaken in order to establish the nature of the hemolytic factors produced by *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* and their host-pathogen relationship associated with *Candida* BSIs.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)–Brazil, Fundação Araucária/SETI/Governo do Paraná–Brazil, Ministério da Saúde/DECIT, MCT/CNPq and PROPPG/UEL-Brazil. E.J.G.F. and D.F. are fellowship-holder of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brazil.

Disclosure of conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

1. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidaemia in adults and children hospitalised in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1232–1239.
2. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; **20**: 485–506.

3. Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, Rello J, Dimopoulos J. Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and non-*albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *Int Antimicrob Agents* 2009; **33**: 554.e1–554.e7.
4. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC *et al.* and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1866–1871.
5. Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 255-259.
6. Caggiano G, Iatta R, Laneve A, Manca F, Montagna MT. Observational study on candidemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. *Mycoses* 2008; **51**: 123-128.
7. Anunnatsiri S, Chetchotisakd P, Mootsikapun P. Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review. *Int J Infect Dis* 2009; **13**: 90-96.
8. Gomez J, Garcia-Vasquez E, Espinosa C, Ruiz J, Canteras M, Hernandez-Torres A, Banos V, Herrero JÁ, Valdez M. Nosocomial candidemia at a general hospital: The change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). *Rev Iberoam Micol* 2009; **26**: 184-188.
9. Aydin F, Bayramoglu G, Guler NC, Kakikkaya N, Tosun I. Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey. *Med Mycol* 2011; **49**: 316-319.
10. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 327-335.

11. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 606-625.
12. Lim CS-Y, Rosli R, Seoe HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 21-31.
13. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; **36**: 288-305.
14. Bullen J. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981; **3**: 1127-1138.
15. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindall, 1988.
16. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; **62**: 5154-5156.
17. Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **232**: 350-353.
18. Pendrak ML, Yan SS, Roberts DD. Sensing the host environment: recognition of haemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* 2004; **426**: 148-56.
19. Favero D, França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses* 2011; **54**: e816-e820.
20. França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto, MC. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* 2010; **54**: e44-e51.

21. Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RMB, Furlaneto-Maia L, Rodrigues R, Oda S, Oliveira MT, Serpa R, França EJG. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; **44**: 595-599.
22. Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. 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 Infet Dis* 2003; **22**: 693-696.
23. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284-292
24. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2971-2974.
25. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a hemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; **145**: 689-694.
26. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J HospInfect* 2005; **59**: 159-162.
27. Yigit N, Aktas E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *J Mycol Med* 2009; **19**: 110-115.
28. Girish Kumar CP, Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol* 2006; **44**: 99-101.
29. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 2007; **164**: 265-269.

30. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* 2009; **11**: 753-761.
31. Gultekin B, Eyigor M, Tiryaki Y, Kirdar S, Aydin N. Investigation of antifungal and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR. *Mikrobiyol Bulteni* 2011; **45**: 306-317.
32. Tay ST, Abidin IAZ, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol* 2011; **49**: 556-560.

Table 1 – Hemolytic activity by bloodstream *Candida* isolates

<i>Candida</i> species (n)	No. of strains (%)			
	Scoring of hemolytic activity			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
<i>Candida albicans</i> (10)	0	20	60	20
<i>Candida tropicalis</i> (13)	0	0	15	85
<i>Candida parapsilosis</i> (08)	100	0	0	0

Hemolytic activity from yeast colonies (plate assay). (-) none activity; (+) weak activity; (++) mild activity; (+++) strong activity.

Figures legend

Fig. 1 – Photograph showing the hemolysis of sheep blood induced by different *Candida* species. *C. albicans* (a), *C. tropicalis* (b) and *C. parapsilosis* (c).

Fig. 2 – Hemolytic activity of *Candida* species. The results are mean values of three independent experiments. * represent a significant difference ($P < 0.05$) according to Kruskal-Wallis test. Vertical lines indicate maximum and minimum values, upper and lower lines of the boxes indicate percentiles 75 and 25, respectively and the traced line of each box indicates median value.

Fig. 3 – Representative photograph showing hemolysis induced by a hemolytic factor produced by *Candida* spp after growth for 48 h (A) and the hemoglobin released

(supernatant obtained following centrifugation at 1000 *g* for 2 min) (B). (+) positive control (total lyses of RBCs in presence of SDS), (a) *C. albicans* isolate 238.05, (b) *C. tropicalis* isolate 14.07, (c) *C. parapsilosis* isolate 75.07 showing different degrees of hemolysis and (-) negative control (RBCs resuspended in RPMI plus PBS buffer).

Fig. 4 – Hemolysis from culture supernatant of *Candida* isolates after growth in RPMI medium for 48 h. The results are means of three independent experiments.

Fig. 1

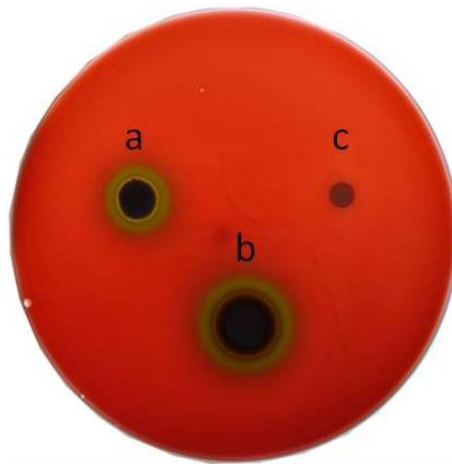


Fig. 2

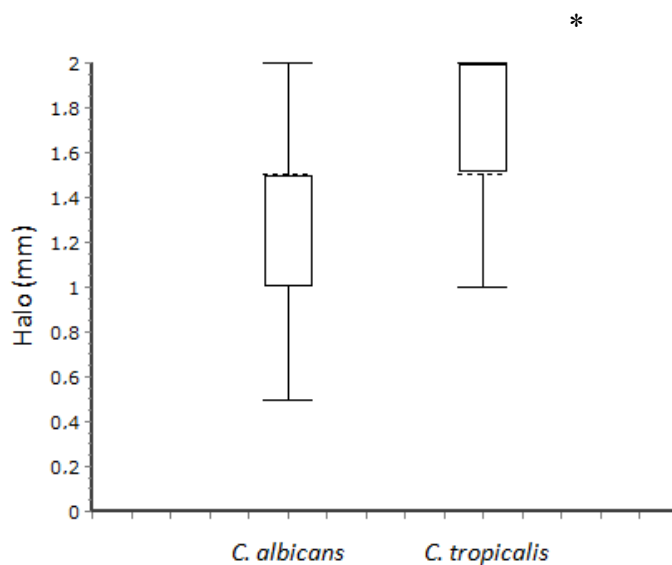


Fig. 3

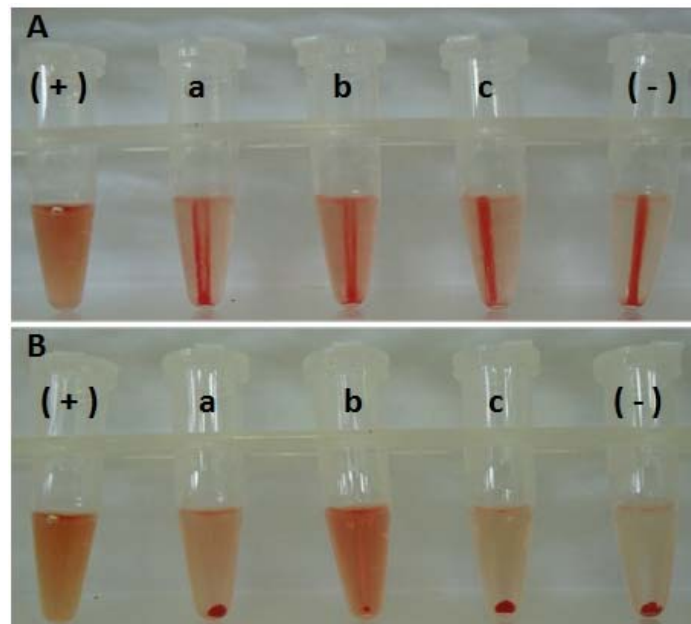
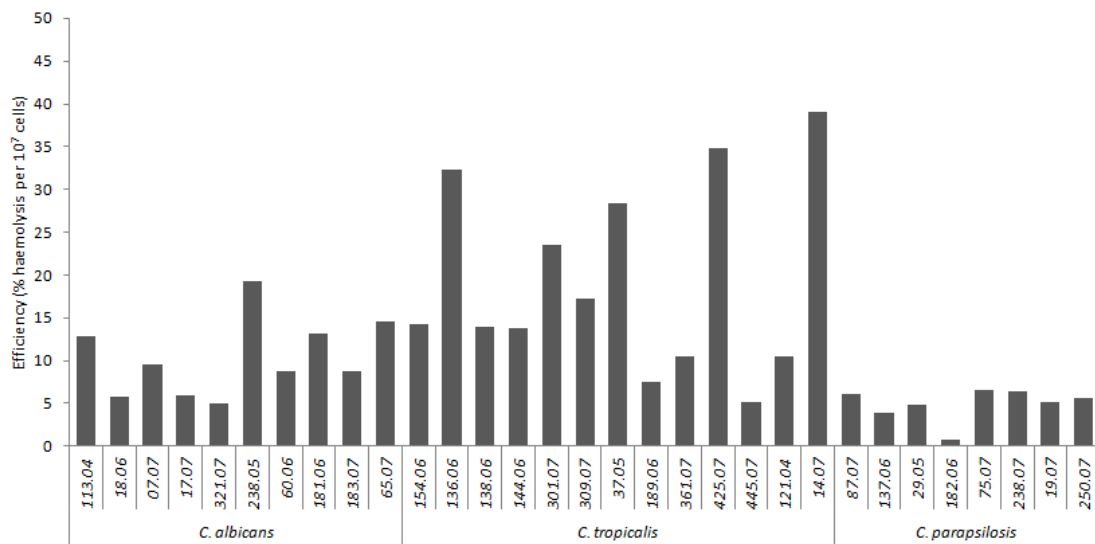


Fig. 4



PARTE II

HEMOLYTIC FACTOR GENE EXPRESSION IN *Candida tropicalis* CLINICAL ISOLATESHEMOLYTIC FACTOR GENE EXPRESSION IN *CANDIDA TROPICALIS* CLINICAL ISOLATES

DANIEL FAVERO^{*}, LUCIANA FURLANETO-MAIA^{**}, EMANUELE J. G. FRANÇA^{*} & MARCIA C. FURLANETO^{***}

ABSTRACT: The production of hemolytic factor is recognized as an important virulence factor in *Candida* species. However, little is known concerning their production and expression by *Candida tropicalis*. Thus, in the present study we analyzed the expression of a putative gene encoding a hemolysin-like protein (HLP) in 12 *Candida tropicalis* clinical isolates, the possible effect of Red Blood Cells (RBCs) on both the *HLP* gene transcripts levels and the hemolytic activity, and assessed a correlation between the mRNA expression profile of *HLP* gene and the hemolytic activity in these isolates. All 12 *C. tropicalis* isolates cultured in presence or absence of RBCs induced the release of hemoglobin by secreting a hemolytic factor and different degrees of hemolysis were observed. Two profiles of differential hemolysis were observed in the RBCs presence: 66.7 % of *C. tropicalis* isolates, showed an increase in their hemolysis promotion at significant levels ($P < 0.05$) when grown in RBCs presence, whereas 33.3 % showed a decrease in this promotion, with no significant differences. At molecular level, we evaluated the expression of a putative *HLP* gene using a RT-qPCR assay both in the presence and absence of RBCs. All isolates were also positive for *HLP* mRNA expression. The expression profile of *HLP* gene concerning RBCs presence allowed us to verify that the putative *HLP* gene is differently expressed as function of the RBCs presence in an isolate-dependent manner. The comparison of the expression profile of *HLP* gene and the hemolytic activity of the *C. tropicalis* isolates showed a highly positive correlation. Our data extend our knowledge about the regulation and molecular basis of hemolytic activity in *C. tropicalis*, and for the first time, evidences a role of *HLP* gene in *C. tropicalis* hemolysis as well as the fact that RBCs can induces changes in transcriptional levels of the putative *HLP* gene in this species.

Keywords: *Candida tropicalis*. Hemolysis. Putative *HLP* gene. RT-qPCR.

* Department of Microbiology, Paraná State University at Londrina, Brazil

** Technological Federal University of Paraná, Brazil

*** Correspondence: Márcia C. Furlaneto. Department of Microbiology, Centre of Biological Sciences, Paraná State University at Londrina. C.P. 6001, CEP: 86051990. Londrina-PR, Brazil. Phone: ++ 55 43 33715736. E-mail furlaneto@uel.br

INTRODUCTION

Non-*albicans* *Candida* species, such as *Candida tropicalis* is being increasingly reported as causative agents of superficial to severe systemic infections. *C. tropicalis* is taxonomically close to *Candida albicans* sharing several pathogenic traits and has been considered as second to *C. albicans* in terms of virulence and clinical importance, especially in tropical regions (Pfaller et al. 2010; Chai et al., 2010; Marra et al., 2011; Furlaneto et al., 2011).

Unfortunately, there still relatively few data on virulence features of *C. tropicalis*. Recently, the hemolytic attributes of this species have been recognized as an important factor related to this pathogenesis, enabling the pathogen to survival and persist in the host (Luo et al., 2001; Malcok et al., 2009; Negri et al., 2010; Favero et al., 2011; Silva et al., 2012).

Once there is essentially no free iron in the human host, the pathogens acquire this from commonly available iron-containing compounds such as hemoglobin (Belanger et al., 1995). Thus, the hemolytic factor secretion releases hemoglobin, which is then used as an iron source by the organism (Manns et al., 1994 and Watanabe et al., 1997), facilitating the hyphal invasion in disseminated candidiasis (Odds, 1988; Pendrak et al., 2004).

At biochemical level, Watanabe et al. (1999) characterized the hemolytic factor produced by *C. albicans* as a mannoprotein secreted by the cells, which structure of the sugar moiety was identified as a cell-wall mannan. According to these authors, the mannoprotein released from *C. albicans* bounds to a specific protein on red blood cells (RBCs) promoting their disruption. For *C. tropicalis*, it was recently reported that the hemolytic factor is secreted from cultures and that the hemolysis promotion can be modulated by environmental factors, like glucose presence (Malcok et al., 2009 and Favero et al., 2011).

However, apart from the phenotypic features of hemolytic activity in *Candida*, there still few data on the molecular basis of the hemolytic factor expression in *Candida* species. Lachke et al. (2000) have described a putative hemolysin gene in *Candida glabrata* termed *HLP*

(hemolysin-like protein) gene. More recently, Luo et al. (2004) demonstrated a role of *C. glabrata HLP* gene in the hemolytic activity of this species.

Since the determination of gene expression levels is often used to identify candidate genes involved in a virulence feature in *Candida* species (Nailis et al., 2010), and the significant gaps in our knowledge concerning hemolytic factor production by *C. tropicalis*, the goals of the present study were to investigate the expression of the putative gene encoding a hemolysin-like protein (HLP) in *C. tropicalis*, to evaluate a possible effect of RBCs on both the *HLP* gene transcripts levels and the hemolytic activity, as well as to verify the possible correlation between the mRNA expression of *HLP* and the hemolytic activity in *C. tropicalis*, extending our knowledge about production and expression of hemolytic factor by this species.

MATERIALS AND METHODS

***Candida tropicalis* isolates**

A total of 12 isolates of *C. tropicalis* included in this study were selected from isolates deposited at the *Candida* culture collection of the Fungal Genetics Laboratory, The University of Londrina-Brazil. Five of them were isolated from blood (136.06, 138.06, 144.06, 189.06 and 301.07), two from nail infection (151.06 and 219.07) and five were isolated from tracheal secretion (197.06, 201.06, 254.07, 344.07 and 335.07) of hospitalized patients at the University Hospital of the University of Londrina – Paraná, Brazil. The isolates obtained were presumptively identified onto CHROMagar *Candida* agar (CA; CHROMagar, France) according to manufacturer's. Identification was confirmed by PCR and was carried out using genomic DNA obtained as described by Furlaneto-Maia et al. (2008) and *C. tropicalis* species-specific forward primer (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 Ca^{2+} - and Mg^{2+} -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 hemolytic activity in the *C. tropicalis* culture supernatant.

Growing conditions

Prior to cultivation in either presence or absence of human red blood cells (RBCs), *C. tropicalis* isolates were grown overnight to stationary phase in RPMI 1640 medium without phenol red (Sigma-Aldrich) at 37°C, 180 rpm. The procedure was repeated once, after which cells were harvested by centrifugation (3000 g for 10 minutes) and washed with sterile buffer (PBS-). The resultant suspensions were then inoculated with an inoculum size of 10^4 cells.ml⁻¹ in either RPMI 1640 (control) or in RPMI 1640 supplemented with human red blood cells (RBCs) type A⁺ (10^8 células.ml⁻¹) (test condition) following incubation at 37°C and 180 rpm for 48 h. Finally, cells were harvested by centrifugation (3000 g for 5 minutes) and used for total RNA extraction. The resulting culture supernatants were assayed for hemolytic activity.

Hemolytic activity from culture supernatant

The culture supernatants were filtered (0.22 µm membranes, Millipore MILLEX GV) to ensure the complete cell removal and concentrated 2.5-times by freeze-drying following storage at -20°C. The culture supernatant and RBCs (1×10^8 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 hemolysis was calculated according to the equation: Hemolysis (%) = $100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_n) \times 100]$; 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. The results are given as the ratio between the hemolysis percentage of the test condition and control. These tests were repeated three times.

Molecular analysis of a putative *C. tropicalis* hemolytic factor encoding gene

Genomic DNA extraction of *C. tropicalis* isolates 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 fenol 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 fenol/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.

In order to amplify a *C. tropicalis* putative *HLP* (hemolysin-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 µl DNA (5 ng/µl), 612.5 µmol 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 amplicon obtained was sequenced using the DYEnamic ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) on MegaBACE 1000. Characteristics of the obtained sequence like homologies and hydrophobicity profile were predicted by online tools. The alignment and comparison of the nucleotide sequence with sequences in the databases were performed using BLAST tools available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Transmembrane regions prediction was performed using TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

Primers design

â-Actin (reference gene) and *HLP* specific (*HLP*) primers of *C. tropicalis* were designed for real-time PCR analysis using Gene Runner 3.05 software (<http://www.generunner.com>). Both have been designed with melting temperature (T_m) between 58 °C and 60 °C and so that their amplification products present 129 and 151 bp respectively, since large size differences in amplicons can interfere with the analysis when employed SYBR ® Green system. The oligonucleotides did not show, when analyzed with itself and/or your partner, hairpin loops, dimmers, bulge loops or internal loops according to program analyses. Primer specificity was checked using BLAST analysis (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) searches against the GenBank database. Standard gel electrophoresis using a 2% TBE gel was used to check for a single product of the expected size.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

The assessment of differential expression of the *HLP* gene was performed after culture in RPMI (control) and RPMI supplemented with RBCs (test condition). After 48 h cultures, *C. tropicalis* cells were harvested, washed using distilled sterile water, suspended in Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies) and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted with Trizol[®], according to manufacturer's instruction and suspended in 30 μ l of DEPC-treated water. Purity of the total RNA extracted was determined as the 260/280 nm ratio and integrity was checked by electrophoresing on 1% agarose gel. Residual DNA was removed by treating RNA with RNase free DNase I (Invitrogen). RNA was stored at -80°C until further use and quantified with a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.). 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), 2 μ l of 10x PCR Buffer, dNTP mixture (200 μ M), Oligo (dT)12-18 primer (0.4 μ M), RNase OUT (4 U) and reverse transcriptase RT M-ML V (0.5 U) (Invitrogen). The mixture was incubated at 42°C for 60 min. Synthesis reactions were performed in a GeneAmp[®] PCR system (Eppendorf, Mastercycler gradient).

Reverse transcription–qPCR.

To quantify cDNA generated by reverse transcription from target RNA, reverse transcription–qPCR was carried out in a PTC-200 DNA Engine Cycler (MJ Research) with a Chromo4[™] Four-Color Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EUA) along with fluorescence signal detection (SYBR Green[®]) after each amplification cycle. The 20 μ l reaction was performed by using the Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies), *HLP*-F (20 μ M) and *HLP*-R (20 μ M) primers, and 6 μ l of a 1:20 cDNA dilution of each isolate in their respective growing conditions. The negative

controls (with no DNA template) for each primer set were included in each run. The mixture was subjected to the following amplification program: 2 min at 50°C; 5 min at 95°C; 40 cycles at 94°C for 30 s, 56,6°C for 30 s and 72°C for 1 min, with an additional extension (72°C, 10 min). Samples were analyzed in triplicate and the relative transcript abundance was normalized to the constitutively expressed β -actin (*ACT*) gene, 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⁻¹ from 50°C to 98°C. RNA extraction and measurement of gene expression by RT-qPCR were performed in triplicate.

RT-qPCR data were normalized with $\hat{\alpha}$ -Actin (*ACT*) an active reference genes in our assays, as this have previously shown to be stably expressed in both culture conditions. Normalized data were then used to calculate the relative gene expression levels. An expression level corresponds to the expression of *HLP* gene at RBCs presence relative to its expression in RPMI medium.

Statistical analysis

SPSS 17.0 software (SPSS Inc.) was used in the statistical analyses of hemolytic activity. Tukey test and ANOVA were used in order to evaluate the significant differences in hemolytic activity promoted among the isolates. And Kruskal-Wallis test was used to evaluate the significant differences in hemolytic activity promoted by the isolates grown in each of the two growth conditions.

The relative expression software tool REST © (Pfaffl et al. 2002) was used to determine the relative expression of the *HLP* gene in different culture conditions evaluated, and to test whether the expression differences were significant. Were considered by the program differentially expressed genes whose induction or repression was significantly different ($p =$

0.001) when cultured in presence of RPMI supplemented with RBCs as compared to the control (absence of RBCs).

Data from RT-qPCR reactions were previously analyzed using MJ Opticon Monitor TM Analysis Software (MJ Research) for determination of C_q (Quantification cycle) for each reaction and their respective efficiencies of amplification. The C_q value for *HLP* and *ACT* genes was measured and the expression level of *HLP* of the different isolates was analyzed using efficiency adjusted normalization method calculated by the formula: $\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_q}$ $\text{target}(\text{Mean control}-\text{Mean sample}) / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_q \text{ ref}(\text{Mean control}-\text{Mean sample})}$, representing the x-fold difference from the calibrator (*ACT*) (Pfaffl et al. 2001). Differences in expression between control and treated samples were assessed in group means for statistical significance by randomization tests (Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test©), according to Pfaffl et al. (2002). The experiment was conducted with similar results using three sets of cDNA.

RESULTS

Hemolytic activity of *C. tropicalis* clinical isolates

In this study we evaluated the production of hemolytic factor by clinical isolates of *C. tropicalis* in either absence or presence of human red blood cells (RBCs).

Under these culture conditions, all 12 *Candida* isolates tested produced hemolytic factor that induced the release of hemoglobin. The hemolytic activity, expressed as percentage of hemolysis, varied from 0.010 to 0.022% and 0.015 to 23.50% following growth in RPMI medium and RPMI supplemented with RBCs, respectively (data not shown). Our data revealed that there were not differences in hemolytic activity among isolates cultivated in the same condition (either absence or presence of RBCs) ($P > 0.05$). Besides, two profiles of hemolytic activity were observed with respect to the presence RBCs. The majority of the *C. tropicalis* isolates, 66.7 %, showed an increase in their capability to promote hemolysis when

grown in the presence of human RBCs, compared to the RPMI cultures, whereas 33.3 % showed a decrease in this capability (Table 1). The relative hemolysis data, obtained by dividing the values of hemolysis percentage in test condition on the control condition, are shown in Table 1. Here, all isolates that exhibited an increase in hemolytic activity had these differences at statistically significant levels ($P < 0.05$) and, interestingly, these significant differences were not found for any isolate that showed reduction in the hemolysis.

Sequence analysis of the putative *C. tropicalis* hemolysin-like protein gene

The employment of *C. tropicalis* genomic DNA as a template and gene-specific primers for the *Candida glabrata* HLP gene (as described in methods) resulted in an amplicon of approximately 400 bp. After being sequenced and submitted to BLASTN analysis (BLASTN algorithm against the GenBank database) the amplicon obtained showed high identity (98%) to a *C. tropicalis* predicted protein mRNA (*Candida tropicalis* MYA-3404, GenBank: XM_002547122).

The corresponding amino acid sequence of the obtained ORF had significant similarities to an uncharacterized threonine-rich GPI-anchored glycoprotein of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL Uniprot database: Q96WV6), indicating a possible domain presence that leads to a cell surface subcellular location. Additionally, the *in silico* analysis inferred gene ontology of this sequence indicated as a cellular component located on external side of cell wall.

Moreover, the BLASTN analysis also revealed a high identity (70%) to a *C. albicans* hypothetical protein SC5314 (CaO19.11047, GenBank: XM_709892) annotated as an ORF similar to cell wall mannoprotein DAN4p of *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL Uniprot database: P47179). The correlation between *C. tropicalis* and *C. albicans* sequences were also

supported by the hydrophobicity profile obtained by TMpred analyses (Fig. 1). Thus, raising the hypothesis that the *C. tropicalis* putative *HLP* gene encodes a cell wall mannoprotein.

The complete ORF of the *C. tropicalis* sequence was also used to design gene-specific primers for a *C. tropicalis* putative hemolysin-like protein (*HLP*) gene. The employment of these primers was successfully applied against *C. tropicalis* genomic DNA which resulted in an amplicon of 151 bp (data not shown). Primers for *C. tropicalis HLP* gene and for an active reference control *ACT* (β -actin) gene were used in the expression analysis by the employment of quantitative real time PCR (qPCR) method.

Quality control of quantitative real time PCR (qPCR) primers

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis indicated that each primer pair was specific for the *HLP* and *ACT* *C. tropicalis* genes, and would not cross-react with sequences from other organisms (data not shown). Gel electrophoresis and melting curve analysis confirmed the presence of the expected PCR products only, and the absence of unwanted non-specific products. Non-inoculated media failed to show evidence of gene expression (data not shown), confirming that each primer pair was specific for its corresponding *C. tropicalis* gene. Using the optimized qPCR assays, we found that *HLP* and *ACT* genes were expressed either presence or absence of RBCs at 48 h.

Expression profiling of hemolysin-like protein gene using RT-qPCR

The transcription levels of the putative *HLP* gene in *C. tropicalis* clinical isolates following growth in either presence or absence of RBCs were evaluated by the employment of quantitative real-time RT-PCR.

At 48h, expression of both *HLP* and *ACT* genes were detected in the two culture conditions tested for all *C. tropicalis* isolates used. *HLP* gene expression levels (relative to the

expression in the RPMI culture) of *C. tropicalis* isolates are shown in Table 2. Two profiles of expression were observed concerning RBCs presence, 66.7 % of *C. tropicalis* isolates showed *HLP* up-regulation, with an induction factor ranged from 1.044 to 6.965-fold, whereas 33.3 % showed *HLP* down-regulation, with a repression factor of 1.338 to 4.429-fold.

Expression levels were statistically significant ($p \leq 0.001$) for 75% of isolates that exhibited induction of expression of *HLP* gene. Besides, for isolates that exhibited down-regulation of *HLP* gene, the expression levels were significantly ($p \leq 0.001$) lower for all isolates.

DISCUSSION

The aims of the present study were to investigate the expression of a putative hemolysin-like protein (*HLP*) encoding gene by *C. tropicalis* clinical isolates and to assess a possible correlation between the levels of the *HLP* transcripts with the profile of hemolytic factor production following growth in either presence or absence of human RBCs.

Our results showed that all *C. tropicalis* isolates released a hemolytic factor in both RPMI medium and RPMI supplemented with RBCs, being able to promote hemolysis of human red blood cells.

Although previous studies reported that isolates of *C. tropicalis* are capable to promote *in vitro* hemolysis (Luo et al., 2001; Furlaneto-Maia et al., 2008; Galán-Ladero et al., 2010, França et al., 2010a,b; Negri 2010) few studies aimed to evaluate the effect of culture conditions in the promotion of hemolysis by *C. tropicalis* (Malcok et al., 2009; Favero et al., 2011). We have recently showed that the production of hemolytic factor by *C. tropicalis* is time dependent and that it occurred in a glucose-dependent manner (Favero et al., 2011). Additionally, Malcok et al. (2009) found that the promotion of hemolysis by *C. tropicalis* was enhanced by glucose-enrichment medium.

In this study, no significant differences in the hemolytic factor production among isolates were observed in neither of the culture conditions tested, e.g., absence or presence of human RBCs. However, for the majority of the isolates, the yeast growth in the presence of RBCs resulted in higher hemolytic activity, indicating a new culture condition in which *C. tropicalis* promote an enhanced level of hemolysis. Mostly interesting is the fact that human red blood cells seems to modulate the production of the hemolytic factor and that is occurs in an isolate-dependent manner.

The data obtained here, together with previous reports that glucose mediates hemolysis in *C. tropicalis* (Malcok et al., 2009; Favero et al., 2011), suggest that hemolysis in this species is triggered under specific culture conditions, so far by glucose and red blood cells enrichment.

Somehow surprisingly, our data reveals that the effect of red blood cells as promoter of hemolytic factor production seems to be isolate-dependent, since 75% of the isolates showed an increase in hemolytic activity and 25% a decrease. For *C. albicans* it has been showed that the response of isolates, on regard of proteolytic activity and the *SAP2* (secreted aspartyl proteinases) gene expression, to antifungal presence were variable among isolates (Copping et al., 2005). These results make clear that both the production and regulation of virulence factors in *Candida* species are a complex phenomena, which emphasizes the need for studies that aim to clarify the mechanisms underlying the existence of differences between isolates in response to certain stimuli.

In order to analyze the profile of the *HLP* expression by *C. tropicalis* we employed a quantitative real time PCR method. The expression of the *C. tropicalis HLP* gene was constitutively in all *C. tropicalis* isolates tested, and basal levels of transcripts found in both culture conditions evaluated. Recently, Nailis et al. (2010) showed that genes encoding virulence factors such as adhesins and extracellular hydrolases in *C. albicans* biofilms were constitutively expressed under a particular condition, even in different systems.

Concerning hemolysin-like protein encoding gene, Luo et al. (2004) using reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay also found the expression of the *C. glabrata HLP* gene in all isolates tested. According to these authors, these data indicate that *HLP* gene expression may be a common biological characteristic of this species.

Likewise, our results appear to agree with this data since basal levels of transcripts were found in all isolates under both culture conditions, indicating that also in *C. tropicalis* the *HLP* gene may have an ubiquitous expression, representing an important feature in this species. This hypothesis is corroborated by considering the expected biochemical composition and cellular location of *C. tropicalis* hemolytic factor, as indicated by similarities in their sequence and analysis of the possible homology relationship with the *C. albicans* hemolytic factor.

To examine whether the human RBCs modulates the *HLP* gene expression in *C. tropicalis* and to evaluate a possible correlation between the transcripts levels with the profile of hemolysis promoted by different clinical isolates, the fold expression (expression level) of *HLP* gene was compared between the two culture conditions. Thus expression levels for *HLP* gene was determined by quantifying gene expression in cells grown in RPMI plus RBCs relative to gene expression in cells grown in RPMI. The *HLP* gene transcripts levels were increased from cultures supplemented with human RBCs, for most isolates tested, reaching statistical significance at 75%.

It is important to highlight that all isolates that exhibited enhanced transcripts levels, regardless of achieving statistical significance levels, also showed hemolysis levels significantly increased.

The isolates that exhibited reduction in *HLP* gene expression also presented reduced hemolysis levels. Together, these data indicate a highly positive correlation between the two

parameters, phenotypic and genotypic expression of hemolytic activity, which tacitly implies a direct role of the *HLP* gene in the hemolytic activity of *C. tropicalis* isolates.

In recent years, studies related to the culture conditions in which various virulence factors are expressed in *Candida* have received wide attention, however, studies regarding the mechanisms underlying the promotion of hemolysis still relatively scarce. As far we know this the first study conducted to analyze the differential expression of a gene encoding a hemolytic factor in *C. tropicalis*, or even in *Candida* species. Our data revealed the occurrence of isolate-dependent response similarly to found for hemolytic factor production. Similar data have been described for other virulence factors in *Candida*. For instance, Silva et al (2010) found a wide spectrum of expression profiles of genes encoding for aspartic acid proteases (*SAPs*) in *C. tropicalis* on the course of epithelial infection. According to these authors, the *SAPs* expression patterns occurred in a isolate-dependent manner.

Nailis et al. (2010) evaluated the expression of genes related to virulence factors in *C. albicans*, and found that many genes, including genes of the families *SAP*, *PLB* (phospholipases) and *LIP* (lipase), exhibited a model-dependent expression under conditions of biofilm formation.

The comparative analysis of the effect of red blood cells, during cell growth, on the level of hemolysis and *HLP* gene expression by different isolates showed a 100% correlation, e.g., all isolates that exhibited enhanced levels of transcripts, in the presence of RBCs, also showed increased production of hemolytic factor revealed by the levels of hemolysis.

Similarly, the isolates that exhibited a repressive response, e.g., exhibited diminished levels of transcripts, in the presence of RBCs, also showed reduced production of hemolytic factor revealed by the levels of hemolysis. These data reinforce the hypothesis of a correlation between the levels of *HLP* gene expression and levels of *in vitro* hemolysis.

The data obtained in this study suggest that the *C. tropicalis* hemolytic factor, like in *C. albicans*, correspond to a cell wall component. Considering that the cell wall is a dynamic structure, its composition and architecture respond to changes in external conditions and internal stimuli (Kapteyn et al., 1999), in our case, to the presence of human RBCs during yeast growth.

Since, there is extensive evidence for the effects of growth conditions on transcriptional activation or repression of specific cell wall proteins in yeasts. For instance, the transcript level of the *Saccharomyces cerevisiae* putative cell wall proteins encoding genes (*UTR2*) were 5-fold more abundant in rich medium than in minimal medium, whereas *SEDI* was expressed at intermediate levels in rich medium, but became highly expressed in minimal medium. *TIR1*, a gene that encodes one of the major cell wall protein in *S. cerevisiae*, transcription is also stimulated by cold shock, under anaerobic conditions, and by glucose (Kapteyn et al., 1999).

According to Kapteyn et al. (1999), the cell prefers specific proteins as constituent of its cell wall, not only during the distinct phase of the cell cycle but also dependent on growth conditions. The reason for this in most cases is unknown, even studies related to deletion of genes encoding GPI-CWPs often does not lead to informative phenotypes.

To conclude, our study on the *C. tropicalis* hemolytic factor illustrated not only the phenotypic characteristics of hemolytic production, e.g., responses to the RBCs presence, but also, for the first time, tacit evidence for a role of *HLP* in hemolytic factor production by this species. Furthermore, relative gene expression, revealed that RBCs can induce differential expression of *HLP* gene in *C. tropicalis* in an isolate-dependent manner and probably is a constituent of yeast cell wall.

REFERENCES

1. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA, and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; **48**: 1366-1377.
2. Chai LYA, Denning DW & Warn P. *Candida tropicalis* in human disease. *Crit Rev Microbiol* 2010; **36**: 282-298.
3. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC *et al.* and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1866–1871.
4. Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RMB, Furlaneto-Maia L, Rodrigues R, Oda S, Oliveira MT, Serpa R & França EJG. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; **44**: 595-599.
5. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2971-2974.
6. Malcok, H. K.; Aktas, E.; Ayyildiz, A.; Yigit, N.; Yazgi, H. Hemolytic Activities of the *Candida* Species in Liquid Medium. *The Eurasian Journal of Medicine* 2009; **41**: 95-98.
7. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TIE, Azeredo J, Oliveira R. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates From Hospitalized Patients. *Mycopathologia* 2010; **169**: 175-82.
8. Favero D, França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses* 2011; **54**: e816-e820.
9. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; **36**: 288-305.
10. Belanger M, Begin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* 1995; **63**: 656-662.
11. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; **62**: 5154-5156.
12. Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **232**: 350-353.
13. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindall, 1988.

14. Pendrak ML, Yan SS, Roberts DD. Sensing the host environment: recognition of haemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch Biochem Bioph* 2004; **426**: 148-56.
15. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a hemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; **145**: 689-694.
16. 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* 2000; **68**: 884-895.
17. Luo G, Samaranyake LP, Cheung BPK, 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* 2004; **112**: 283-290.
18. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H and Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiology* 2010; **10**:114-124.
19. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 2008; **66**: 209-217.
20. Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. 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 Infet Dis* 2003; **22**: 693-696.
21. Gácsér A, Salomon S; Schafer W. Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **245**: 117-121.
22. Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; **49**: 4608-4615.
23. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**:e36.
24. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**:2002-2007.
25. Galán-Ladero MA, Blanco MT, Sacristán B, Fernández-Calderon MC, Perez-Giraldo C, Gomez-Garcia AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol* 2010; **48**: 207-10.
26. França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto, MC. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and

Candida tropicalis with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* 2010a; **54**: e44-e51.

27. França EJG, Favero D, scremin H, Oliveira MT, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010b; **43**: 318-321.
28. Copping VMS, Barelle CJ, Hube B, Gow NAR, Brown AJP, Odds FC. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted protease genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **55**: 645-654.
29. Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J and Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect* 2010; **17**: 264–272.
30. Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1462**:373-383.

Table 1 – Hemolysis promoted by *Candida tropicalis* clinical isolates following growth in either absence (RPMI medium) or presence of human red blood cells (RBCs) (RPMI+RBCs)

Hemolysis		
Isolates	test condition/control	test condition vs control
136.06	1.25	Up ≠
138.06	2.5	Up ≠
144.06	1.38 .10 ⁶	Up ≠
189.06	1.06	Up ≠
301.07	0.94	Down
151.06	1.88	Up ≠
219.07	1.13	Up ≠
197.06	0.94	Down
201.06	1.29	Down
254.07	1.14 . 10 ⁶	Up ≠
344.07	1.67	Up ≠
335.07	0.95	Down

≠ Significantly different by Kruskal-Wallis Test.

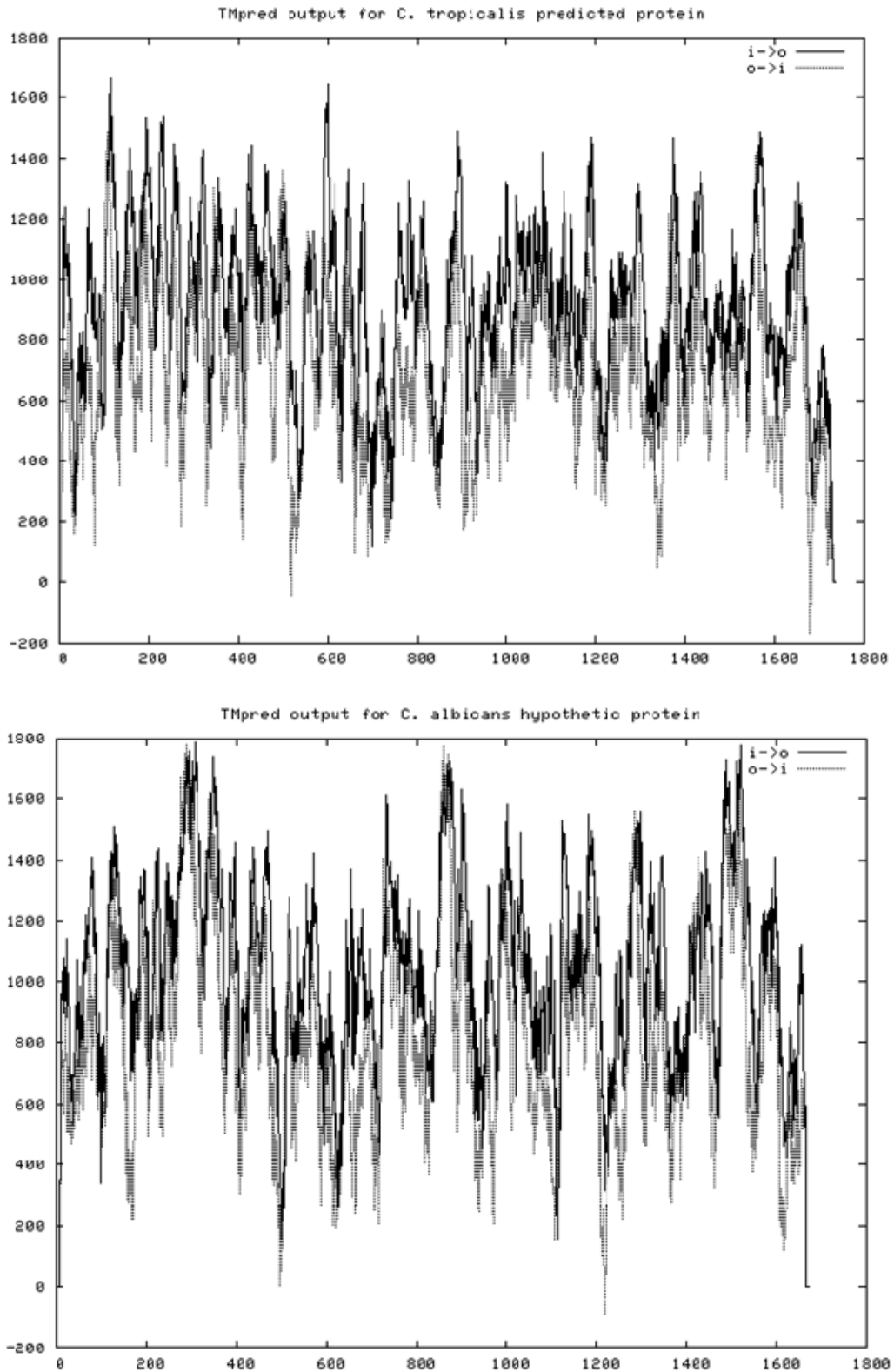
Table 2 – Relative expression of the *HLP* gene by *Candida tropicalis* clinical isolates following growth in either absence (RPMI medium) or presence of human red blood cells (RBCs) (RPMI+RBCs)

Isolates	Relative expression	
	Expression factor	Regulation
136.06	1.244	Up *
138.06	1.669	Up
144.06	1.654	Up *
189.06	1.044	Up *
301.07	4.429	Down*
151.06	6.965	Up *
219.07	1.78	Up
197.06	1.902	Down*
201.06	3.82	Down*
254.07	2.032	Up *
344.07	6.905	Up *
335.07	1.338	Down*

* Significantly different by REST Software.

Figures legend

Fig. 1 – Hydrophobicity profile obtained by TMpred analyses. (A) TMpred obtained for *C. tropicalis* predicted protein. (B) TMpred obtained for *C. albicans* hypothetical protein.



CONCLUSÕES:

- Espécies de *Candida* provenientes de cultura sanguínea exibem diferentes perfis de atividade hemolítica *in vitro*;
- Para análise da atividade hemolítica de isolados de *C. parapsilosis* o emprego de ensaios utilizando sobrenadantes de cultivo é mais apropriado do que ensaios em meio solidificado;
- Há uma elevada correlação entre a expressão do gene *HLP* e a atividade hemolítica em *C. tropicalis*;
- O gene *HLP* em *C. tropicalis* apresenta um papel na determinação da atividade hemolítica desta espécie;
- A presença de eritrócitos (RBCs) promove alterações na expressão do gene *HLP* de uma maneira isolado-dependente;
- O fator hemolítico em *C. tropicalis* corresponde a uma proteína de parede celular.