

Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*

Production of virulence factors *in vitro* by pathogenic species of the genus *Candida*

Kelly Cristina Ortolan Rörig¹, Jean Colacite¹ e Maxwell Adriano Abegg¹

RESUMO

Avaliou-se, *in vitro*, a capacidade de crescimento em 39°C e 42°C, a produção de enzimas hidrolíticas e a atividade hemolítica de 21 cepas clínicas e de referência de sete espécies de *Candida* spp, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei* demonstraram menor potencial de virulência e *Candida albicans* maior.

Palavras-chaves: *Candida* spp. Fatores de virulência. Enzimas hidrolíticas. Fungos patogênicos.

ABSTRACT

The growth capacity at 39°C and 42°C, production of hydrolytic enzymes and hemolytic activity of 21 clinical and reference strains of seven species of *Candida* spp were evaluated *in vitro*. *Candida dubliniensis* and *Candida krusei* demonstrated lower virulence potential and *Candida albicans* higher potential.

Key-words: *Candida* spp. Virulence factors. Hydrolytic enzymes. Pathogenic fungi.

Leveduras do gênero *Candida* são frequentemente comensais humanos, mas podem, em situações que normalmente envolvem imunodebilidade, causar infecção conhecida como candidíase ou candidose, em diversos sítios anatômicos².

Estas micoses podem ser causadas por diferentes espécies. *Candida albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, mas espécies de *Candida* não-*albicans*, particularmente *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, tem adquirido importância crescente¹⁶.

Por conseqüência, há interesse nos fatores de virulência destas leveduras, para estabelecer estratégias de controle com antifúngicos e prevenção^{4 11}.

A habilidade de produzir enzimas hidrolíticas é considerada um importante fator de virulência⁵. As principais enzimas produzidas por leveduras do gênero *Candida* são as proteinases e as fosfolipases^{1 3}.

Diferentes espécies de *Candida* demonstram atividade hemolítica quando crescidas em ágar-sangue enriquecido^{7 8}.

Outra característica associada com a patogenicidade em humanos é a propriedade de multiplicação a altas temperaturas, como 39°C e 42°C⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de virulência *in vitro* de 21 cepas clínicas e de referência de sete espécies de *Candida*.

Organismos testados. Foi investigado um isolado de referência e dois isolados clínicos de sete espécies (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida dubliniensis*) de *Candida*. Os isolados foram identificados por avaliação morfológica (micromorfologia em ágar fubá-tween 80) e por testes bioquímicos através do Kit Candifast (International Microbio) e API 20 C (bioMérieux).

Pesquisa de enzimas hidrolíticas. A produção de fosfolipase foi verificada utilizando-se o método do ágar gema de ovo em placa, de acordo com Kantarcioglu e Yucel⁴. As placas de Petri foram incubadas a 37°C e os diâmetros das colônias e das colônias mais zonas de precipitação foram mensuradas após 7 dias de incubação. A zona de atividade de fosfolipase (Pz) foi calculada de acordo com Price cols⁹, em termos do índice do diâmetro da colônia dividido pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. A produção de proteinase foi evidenciada através de halos claros em torno das colônias, em placas de ágar contendo albumina de soro bovina (BSA), conforme Kantarcioglu e Yucel⁴. O índice Pz foi determinado da mesma forma que para a fosfolipase.

A atividade de amilase foi testada com meio contendo 3% de amido de batata solúvel, com pH ajustado a 5, de acordo com Tsuyoshi cols¹⁵. Os halos de atividade foram revelados como zonas claras em torno das colônias pela adição de lugol.

1. Curso de Farmácia, Universidade Paranaense, Toledo, PR.

Endereço para correspondência: Prof. Maxwell Adriano Abegg. Rua Jurandir DalPrá, 548 apto 12, Vila Becker, 85902-530 Toledo, PR.

Tel: 55 45 3054-1813

e-mail: maxwel@unipar.br

Recebido para publicação em 17/03/2008

Aceito em 05/03/2009

A produção de gelatinase foi verificada em placa contendo 0,8% de gelatina e 5% de ágar. Uma alçada de cada isolado foi inoculada na superfície do ágar e este foi incubado a 30°C por 7 dias. A produção de gelatinase fica evidente pela formação de halos claros em torno das colônias, utilizando ácido tricloroacético como revelador, conforme Kanemitsu cols³.

Crescimento a 39°C e 42°C. Para isto, 10µL de caldo Sabouraud com turvação ajustada ao tubo 1 da escala de Mac Farland, obtido de células novas dos isolados, foi inoculado em ágar Sabouraud-dextrose e incubado a 39°C e 42°C por 72h, de acordo com Llanos cols⁶.

Atividade hemolítica. Foram utilizadas placas de Ágar Sabouraud dextrose contendo 3mL de hemácias de sangue humano lavadas 3 vezes com tampão salina-fosfato (PBS)⁸. Discos de papel filtro com 6mm de diâmetro foram posicionados em pontos equidistantes na placa e inoculados com 10µL de cultivo das células em caldo Sabouraud com turvação ajustada ao tubo 1 da escala de Mac Farland. Todos os testes foram realizados em triplicata para cada isolado.

A **Tabela 1** mostra que os isolados de *Candida albicans* produziram mais proteinase e fosfolipase que as demais espécies. Esta observação concorda com os resultados de Silva cols¹³, que, comparando a produção enzimática de *Candida albicans* (nº=31) e *Candida parapsilosis* (nº=6), observaram que 100%

dos isolados de *Candida albicans* foram produtores de proteinase e 83,8% de fosfolipase. Kantarcioglu e Yucel⁴, estudando a produção de fosfolipase e proteinase em 95 isolados clínicos de várias espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa* e *Candida tropicalis*), igualmente observaram que *Candida albicans* apresentou um percentual significativamente maior de isolados produtores de proteinase e fosfolipase.

Linhares cols⁵ estudaram a atividade enzimática e capacidade hemolítica de *Candida dubliniensis* (nº=18) frente a *Candida albicans* (nº=30). Semelhante ao observado em nosso estudo, claramente *Candida albicans* é maior produtora de fosfolipase e proteinase e também apresenta maior capacidade hemolítica que esta outra espécie.

Tamura cols¹⁴ avaliaram a produção de fatores de virulência (hidrofobicidade da superfície celular, aderência, atividades de proteinase e de fosfolipase) em 23 amostras de: *Candida albicans* (nº=7), *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (nº=6) cada, e *Candida lusitaniae* e *Candida glabrata* (nº=2). A maior atividade de fosfolipase e de proteinase (Pz menor) foi de *Candida parapsilosis* isolada de cateter venoso central. A espécie *Candida albicans* apresentou atividade levemente inferior (Pz maior) à de

TABELA 1

Resultados dos testes de atividade de fosfolipase, proteinase, amilase, crescimento em 42°C e 39°C e atividade hemolítica em 21 isolados de *Candida* spp.

Isolados	Proteinase	Fosfolipase (Pz)	Amilase	Crescimento		Hemólise
				42°C/39°C		
<i>Candida albicans</i> ATCC 18.804	0,36	0,34	+	+/+		+ + + +
<i>Candida albicans</i> UEM 1	0,42	0,38	+	+/+		+ + +
<i>Candida albicans</i> UFRGS 51	1,0	0,37	+	+/+		+ +
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13.803	1,0	0,46	+	+/+		-
<i>Candida tropicalis</i> UFRGS 55	0,43	1,0	+	+/+		-
<i>Candida tropicalis</i> UFRGS 56	1,0	0,48	+	+/+		-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2.001	1,0	1,0	+	+/+		-
<i>Candida glabrata</i> UEM 24	1,0	1,0	+	+/+		-
<i>Candida glabrata</i> UEM 118	1,0	1,0	+	-/+		-
<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 46.036	1,0	1,0	+	+/+		-
<i>Candida guilliermondii</i> UEM 28	1,0	1,0	+	+/+		-
<i>Candida guilliermondii</i> UEM 73	1,0	1,0	+	+/+		-
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1,0	1,0	+	-/+		-
<i>Candida krusei</i> SM 1	1,0	1,0	-	+/+		-
<i>Candida krusei</i> SM 2	1,0	1,0	+	-/+		-
<i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987	0,44	1,0	+	-/+		-
<i>Candida dubliniensis</i> SM 23	0,43	1,0	-	-/-		-
<i>Candida dubliniensis</i> SM 25	0,44	1,0	-	-/-		-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22.019	0,42	1,0	+	+/+		+ +
<i>Candida parapsilosis</i> UEM 115	1,0	1,0	+	+/+		+
<i>Candida parapsilosis</i> UEM 81	1,0	1,0	-	+/+		+

+: positivo, -: negativo, + + + +: muito fortemente positivo, + + +: fortemente positivo, + +: positivo, +: fracamente positivo, Pz: índice de atividade de fosfolipase. 1,0: isolado inativo. ATCC: American Type Culture Collection, EUA, UEM: Universidade Estadual de Maringá, PR, UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, SM: Universidade Federal de Santa Maria, RS, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda.

Candida parapsilosis. De fato, neste estudo *Candida albicans* não se destacou como a maior produtora destas enzimas, sendo sua produção até levemente inferior à de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Estudando espécies de *Candida* quanto à atividade amilásica, Tsuyoshi cols¹⁵ não observaram atividade amilásica em *Candida glabrata*. Rosa cols¹⁰ não observaram atividade de amilase em cinco espécies de *Candida* avaliadas (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*).

Nos testes feitos a 42°C, observou-se que somente os isolados de *Candida dubliniensis* e dois isolados de *Candida krusei* não obtiveram resultados positivos. Já em 39°C, que é uma temperatura de pacientes febris, observou-se que todos os isolados de *Candida dubliniensis* não apresentaram crescimento, isto significa que pacientes imunodebilitados, com temperatura a 39°C podem desenvolver candidíase por certas espécies do gênero. Esta sensibilidade de *Candida dubliniensis* a temperaturas elevadas parece responder em parte pela sua reduzida capacidade invasiva, mesmo em pacientes severamente imunodebilitados.

Somente os isolados de *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* apresentaram atividade hemolítica neste estudo.

Diferentemente, Luo cols⁷ não observaram capacidade hemolítica em cinco isolados de *Candida parapsilosis* avaliados, enquanto reportaram atividade hemolítica em outras espécies. Igualmente neste estudo *Candida albicans* demonstrou ter maior capacidade hemolítica que as demais espécies. Os autores usaram sangue de carneiro, enquanto que neste estudo foi utilizado sangue humano na preparação do meio de cultura. O sangue humano ou o processamento dos cultivos de *Candida* podem ser fatores que dificultam a manifestação da capacidade hemolítica por espécies que não *Candida albicans*.

Esta atividade de enzimas hidrolíticas elevada de *Candida albicans* está de acordo com sua maior virulência em infecções sistêmicas *in vivo*¹⁰. No entanto, Samaranayake cols¹¹, avaliando a expressão de fosfolipase B em 30 isolados de *Candida albicans*, usando placas e teste em caldo, de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), não observaram associação significativa da produção desta enzima com outros quatro fatores de virulência avaliados.

REFERÊNCIAS

1. Candido CR, Azevedo PVR, Komesu CM. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isolados da cavidade bucal. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33: 437-442, 2000.
2. Fonzi A, Calderone RA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology 9: 327-335, 2001.
3. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. Journal of Microbiological Methods 47: 11-16, 2001.
4. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 5: 160-165, 2002.
5. Linares CEB, Loreto ES, Silveira CP, Pozzatti P, Scheid LA, Santurio JM, Alves SH. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 49: 203-206, 2007.
6. Llanos R, Fernandez-Espinar MT, Querol A. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. Antoine Van Leeuwenhoek 90: 221-231, 2006.
7. Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. Journal of Clinical Microbiology 39: 2971-2974, 2001.
8. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infection and Immunity 62: 5154-5156, 1994.
9. Price ME, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20: 7-14, 1982.
10. Rosa EAR, Pereira CV, Rosa RT, Hofling JF. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1343-1349, 2000.
11. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JAMS, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung KWS, Samaranayake LP. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. Journal of Medical Microbiology 54: 583-593, 2005.
12. Schaller M, Borelli C, Korting, HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses 48: 365-377, 2005.
13. Silva JO, Ferreira JC, Candido R.C. Atividade enzimática, produção de *slime* e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 354-355, 2007.
14. Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 91-93, 2007.
15. Tsuyoshi N, Fudol R, Yamanaka S. Identification of yeast strains isolated from marcha in sikkin, a microbial started for amyolytic fermentation. International Journal of Food Microbiology 99: 135-146, 2005.
16. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. Journal of Microbiology Immunology and Infection 36: 223-228, 2003.