

Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal

Enzymotiping of species of the genus *Candida*
isolated from the oral cavity

Regina Celia Candido¹, Rosa Vitória Palamin Azevedo¹ e Marilena Chinalli Komesu²

Resumo Foram avaliadas quanto a produção de exoenzimas fosfolipase e proteinase, 79 amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com lesões bucais características de candidose e indivíduos com boca clinicamente normal, atendidos na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto USP. Dentre as cepas de *C. albicans* isoladas de lesões bucais, a fosfolipase e proteinase foram detectadas em, respectivamente, 83,3% e 66,7%. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* produziram somente proteinase. Quanto às cepas isoladas de nichos sem lesão, do total de 32 *C. albicans*, 71,9% apresentaram fosfolipase e 68,7% proteinase. *C. tropicalis* apresentou apenas a enzima proteinase, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *Candida* spp, não apresentaram nenhuma das exoenzimas. Entre as amostras de *C. albicans* de ambos os grupos, o enzimatipo 22 (fosfolipase positiva e proteinase fracamente positiva) foi prevalente. Enzimatipos diferentes foram detectados em amostras da mesma espécie provenientes de mesmo paciente.

Palavras-chaves: Leveduras. *C. albicans*. Enzimotipagem. Candidose bucal.

Abstract The production of phospholipase and proteinase exoenzymes was evaluated in seventy nine samples of *Candida* isolated from the oral cavity of patients with oral lesions characteristic of candidosis and from individuals presenting a clinically normal mouth, attended at the University of Dentistry of Ribeirão Preto USP. Among the strains of *C. albicans* isolated from oral lesions, the phospholipase and proteinase were detected in 83.3% and 66.7%, respectively. *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* produced only proteinase. Regarding the isolated strains from niches without lesions, out of a total of 32 *C. albicans*, 71.9% presented phospholipase and 68.7% proteinase. *C. tropicalis* only presented the enzyme proteinase, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *Candida* spp did not present any of the exoenzymes. Among the samples of *C. albicans* from both groups, the enzymotype 22 (positive phospholipase and proteinase weakly positive), was prevalent. Different enzymotypes of the same species were detected in samples collected from the same patient.

Key-words: Yeasts. *C. albicans*. Enzymotyping. Oral candidosis.

1. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2. Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Auxílio: FAPESP

Endereço para correspondência. Dr^a Regina Celia Candido. Dept^o de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Telefax: 55 16 602-4163.

e-mail rcandido @gly.fcfrp.usp.br

Recebido para publicação em 13/4/98.

A candidose bucal pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida* entre elas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, bem como por espécies de outros gêneros^{7 9 20}. A quantidade de leveduras na lesão é geralmente alta e, freqüentemente, mais de uma espécie é isolada; neste caso, o papel de determinada espécie na etiologia da doença é de difícil avaliação.

A habilidade em produzir enzimas hidrolíticas é considerado importante fator patogênico². As principais enzimas consideradas como fatores de virulência, produzidas por leveduras do gênero *Candida*, são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos^{5 6}. Foi sugerido que esta propriedade poderia ser usada como um critério para a biotipagem de *C. albicans*^{10 14}.

A atividade de proteinase é variável entre as espécies e cepas do gênero *Candida*. Ray et al¹¹ e De Bernardis et al⁴, utilizando procedimentos

em meios sólidos, não observaram atividade enzimática em *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*. No entanto, com técnicas mais sensíveis como o SDS-PAGE, verificaram que *C. kefyr* e *C. guilliermondii* eram capazes de hidrolisar a albumina, e que *C. glabrata* e *C. krusei* eram destituídas de qualquer atividade proteolítica.

Williamson et al¹⁸, usando o método descrito por Price et al¹⁰ modificado, desenvolveram um novo sistema de tipagem para *C. albicans*, buscando detectar a atividade da enzima fosfolipase de 100 cepas isoladas a partir da cavidade bucal. Verificaram que 94% de *C. albicans* foram produtoras de fosfolipase, com graus de atividade variando com valores de PZ de 0,3 a 0,9.

Delineamos este trabalho, tendo como objetivo a detecção de enzimas extracelulares fosfolipase e proteinase pelas espécies de leveduras isoladas da cavidade bucal de pacientes com e sem candidose bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 50 indivíduos adultos entre os pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto USP. Deles, 19 apresentavam boca clinicamente saudável (grupo controle) e 31 possuíam algum tipo de lesão intra-oral, com suspeita clínica de candidose bucal, entre elas, estomatite protética, glossite rômbica mediana, queilite angular, língua fissurada.

Amostras do dorso da língua, lesão e saliva foram semeadas no ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol, incubado a 37°C, durante 3 a 5 dias. Após o isolamento, as leveduras foram identificadas seguindo a metodologia clássica¹⁷.

Setenta e nove cepas do gênero *Candida*, foram submetidas à prova de detecção de enzimas fosfolipase^{10 18} e proteinase¹². Volumes de aproximadamente 5ml de suspensões de cepas em água destilada esterilizada, equivalente a 1 da escala de MacFarland foram inoculadas em pontos equidistantes, respectivamente, nos meio de ágar fosfolipase e ágar proteinase. Os testes foram realizados em duplicata. As placas contendo 4 inóculos de diferentes cultivos, permaneceram incubadas a 37°C, durante 4 dias para fosfolipase e 7 dias para proteinase.

A presença de enzima fosfolipase foi observada pela formação de uma zona opaca ao redor da colônia da levedura e a atividade enzimática (PZ) foi medida dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. PZ foi codificada com um dígito, com valores iguais a 1, 2 ou 3 (enzimotipo), respectivamente, para as cepas não produtoras desta enzima (PZ = 1), para a atividade média (PZ \geq 0,64 < 1,0) e para a atividade enzimática elevada (PZ \leq 0,63).

A presença da enzima proteinase foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia da levedura. Proteinase foi codificada com dígitos variando de 1 a 4, de acordo com o grau de atividade enzimática, ou seja, sem atividade ou negativa = 1; fraca, halo menor que 1mm = 2; média, halo entre 1 a 2mm = 3 e forte, halo maior que 2mm = 4.

As cepas foram codificadas com algarismos contendo 2 dígitos representados, respectivamente, por fosfolipase e proteinase. O enzimotipo 11, representado as cepas fosfolipase e proteinase negativas e o enzimotipo 32 as amostras fosfolipase fortemente e proteinase fracamente positivas.

RESULTADOS

Verificamos que *C. albicans* foi a mais prevalente em todos os tipos de amostras examinadas. Entre os pacientes com lesões

características de candidose bucal, outras espécies, também, foram isoladas, principalmente, de saliva e lesão, com uma freqüência maior para

C. tropicalis e *C. glabrata*. *C. guilliermondii* e *C. krusei* foram detectadas somente de pacientes do grupo controle conforme representado na Tabela 1, a maioria (58,8%) das leveduras isoladas de lesão apresentaram atividade da enzima fosfolipase e proteinase.

Quanto às cepas isoladas de nichos sem lesão, verificamos que 23 (51,1%) produziram

fosfolipase e, 26 (57,8%) proteinase; destacando-se que 15 (33,3%) apresentaram ambas enzimas estudadas (Tabela 1).

Em relação às espécies do gênero *Candida* isoladas, da cavidade bucal, com e sem candidose, respectivamente, 83,3% e 71,9% das *C. albicans* apresentaram atividade de fosfolipase e 66,7% (lesão) e 68,7% (sem lesão) foram positivas para

Tabela 1 - Perfil da atividade enzimática das leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal.

<i>Candida</i>	Atividade enzimática													
	fosfolipase				proteinase				fosfolipase x proteinase					
	negativa		positiva		negativa		positiva		nenhuma		ambas		uma	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Com lesão (34)	14	41,2	20	58,8	14	41,2	20	58,8	6	17,6	12	35,3	16	47,1
Sem lesão (45)	22	48,8	23	51,1	19	42,2	26	57,8	11	24,4	15	33,3	19	42,2

proteinase (Tabela 2). *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Candida spp* não demonstraram produção de fosfolipase.

Proteinase foi detectada apenas nas amostras de *C. tropicalis* isoladas de ambos os grupos e de *C. parapsilosis* isolada de lesão (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade enzimática das diferentes espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes com e sem lesão bucal.

Espécies	Com lesão						Sem lesão					
	cepas		fosfolipase		proteinase		cepas		fosfolipase		proteinase	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<i>C. albicans</i>	24		20	83,3	16	66,7	32		23	71,9	22	68,7
<i>C. tropicalis</i>	5		0	0	3	60	6		0	0	4	66,7
<i>C. glabrata</i>	3		0	0	0	0	2		0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	1		0	0	1	100	1		0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	0		0	0	0	0	1		0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0		0	0	0	0	2		0	0	0	0
<i>Candida spp</i>	1		0	0	0	0	1		0	0	0	0
Total	34		20		19		45		23		24	

Conforme apresentado na Tabela 3, foram detectados 10 diferentes enzimatipos, com prevalência do 11 representando as 17 amostras negativas para a produção de fosfolipase e proteinase, sendo 2 *C. albicans* e as demais *Candida spp*. O segundo enzimatipo foi o 22 representando as amostras fosfolipase positivas e proteinase fracamente positivas, este foi detectado somente em 16 *C. albicans*. O enzimatipo 14 (fosfolipase negativa e proteinase

fortemente positiva) foi verificado em apenas 1 *C. parapsilosis* isolada de lesão. Os demais enzimatipos foram encontrados com frequência variável.

Em relação aos 4 pacientes que apresentavam lesões múltiplas (Tabela 4), observamos que eram causadas por cepas da mesma ou de espécies diferentes, sendo que as espécies iguais apresentaram enzimatipos iguais somente em uma ocasião (paciente 19).

Tabela 3 - Distribuição dos enzimatipos de espécies de *Candida* isolados de lesão e de outros nichos da cavidade bucal.

Enzimatipos	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>Candida spp*</i>	
	lesão	outros nichos	lesão	outros nichos	lesão	outros nichos
11		2	2	2	4	7
12	3	5	1	3		
13	1	2	2	1		
14					1	
21	5	5				
22	7	9				
23	1					
31	3	3				
32	4	5				
33		1				
Total	24	32	5	6	5	7

* *C. guilliermondii*; *C. krusei*; *C. glabrata*; *C. parapsilosis*; *Candida spp*

Tabela 4 - Distribuição dos enzimatipos de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de pacientes com múltiplas lesões de candidose bucal.

Paciente	Cepa (nº)	Espécie	Tipo de lesão	Enzimatipo
19	19.1	<i>C. tropicalis</i>	estomatite protética	13
	19.2	<i>C. albicans</i>	glossite rômbrica mediana	31
	19.3	<i>C. tropicalis</i>	glossite rômbrica mediana	11
	19.4	<i>C. tropicalis</i>	queilite angular	13
20	20.2	<i>C. albicans</i>	estomatite protética	22
	20.1	<i>C. albicans</i>	língua fissurada	21
25	25.2	<i>C. glabrata</i>	língua fissurada	11
	25.1	<i>C. albicans</i>	glossite rômbrica mediana	22
39	39.3	<i>C. albicans</i>	estomatite protética	12
	39.1	<i>C. albicans</i>	glossite rômbrica mediana	22

DISCUSSÃO

A detecção das enzimas fosfolipase e proteinase em meios sólidos tem sido descrita, principalmente, em amostras de *C. albicans*.

Quanto ao fato de termos detectado a produção de fosfolipase, somente pelas cepas pertencentes à espécie *C. albicans*, concorda com resultados obtidos por alguns pesquisadores, tal como Samaranayake et al¹⁴, que estudaram a atividade fosfolipásica de 41 cepas de leveduras do gênero *Candida* e observaram que este tipo de enzima era produzida por *C. albicans*, mas, não por *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. No entanto, Shimizu¹⁵ verificou que, além de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, os cultivos de *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, também, evidenciavam atividade e fosfolipase, só que em diferentes percentuais.

Estudos anteriores têm mostrado que 30 a 100% das cepas de *C. albicans* são secretoras de

fosfolipase, com graus variáveis de atividade^{10 14 15}. No Brasil, Maffei⁸ verificou que 51,1% das cepas estudadas apresentavam esta enzima; no estudo de Souza et al¹⁶, este percentual atingiu 73,3%; no de Candido³, 96,6% e Shimizu¹⁵ verificou que 100% das *C. albicans* apresentavam atividade para fosfolipase.

Nossos resultados, em relação à atividade fosfolipásica de *C. albicans*, com graus variáveis de atividade, estão dentro dos parâmetros encontrados por autores estrangeiros^{10 14}. Comparando com resultados de pesquisadores brasileiros, nosso percentual foi maior que o obtido por Maffei⁸ e Souza et al¹⁶. No entanto, foi bem menor que o de Candido³ (96,6%) e Shimizu¹⁵ (100%); o que pode estar relacionado com diversidade de amostragem, principalmente.

Quanto à produção de exoenzimas, pelas leveduras isoladas de lesão bucal, observamos

que 58,8% apresentavam atividade fosfolipásica e proteolítica, ressaltando-se que 35,3% das cepas testadas demonstraram os dois tipos de atividade enzimática; valores semelhantes aos obtidos com leveduras isoladas de nichos sem lesão, indicando a importância de se efetuar uma correlação entre a produção dessas enzimas e a sua patogenicidade, principalmente se isoladas de indivíduos considerados clinicamente saudáveis, para se adotar métodos preventivos mais acurados.

Quanto às espécies isoladas de lesão, observamos que a maior parte das *C. albicans* apresentava atividade enzimática, fosfolipase (83,3%) e proteinase (66,7%). Em relação à *C. tropicalis*, (3/60%) produziram proteinase e, 50% de *C. parapsilosis* (2), também deram resultado positivo para esta prova, demonstrando ser um dos prováveis fatores de virulência deste gênero.

Nossos resultados quanto à detecção de atividade proteolítica foram menores, dos obtidos por Yamamoto et al¹⁹, em relação à *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

Especificamente, em relação aos dados obtidos com as espécies *C. glabrata* e *C. krusei*,

concordam com os de outros pesquisadores^{4 11 19}, que também não observaram atividade proteolítica, se bem que Banerjee et al¹ admitam que *C. glabrata* produza pequena quantidade de proteinase e que não seja excretada.

Analisando-se o grau de atividade enzimática, na detecção de proteinase, verificamos que nossos resultados foram diferentes dos obtidos por Rùchel et al¹³. Esta divergência poderá estar relacionada com o sítio de amostragem; se tem a ver com casos de candidose e com o hospedeiro examinado. Ressaltamos que, em nosso estudo, os resultados obtidos entre as espécies foram diferentes, contrastando com a semelhança observada pelos autores, entre *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Verificamos que foram detectados enzimatipos diferentes, entre cepas isoladas em lesões diferentes, do mesmo paciente. Na maioria das vezes, o padrão indica que pelo menos uma ou ambas as enzimas foram produzidas, comprovando a provável patogenicidade da cepa envolvida, além de ajudar na discriminação, como é o caso do paciente 19, com as cepas detectadas na queilite angular; podendo, portanto, servir como um marcador epidemiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banerjee A, Ganesan K, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. Journal of General Microbiology 137:2455-2461, 1991.
- Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. Journal of General Microbiology 131:1217-1221, 1985.
- Candido RC. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 1991.
- De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan PA, Cassone A. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with Human Immunodeficiency Virus. Infectious Immunity 64:446-471, 1996.
- Ghannoum M, Abu-Elteen KH. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. Journal Medical and Veterinary Mycology 24:407-413, 1986.
- Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses 33:265-282, 1990.
- Kolnick JR. Oral candidosis. Report of case implicating *Candida parapsilosis* as a pathogen. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 50:411-415, 1980.
- Maffei CML. Amostras de *Candida albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996.
- Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. Journal American Academic Dermatology 31:S2-S5, 1994.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry IO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20:15-20, 1982.
- Ray TL, Payne CD. *Candida albicans* acid proteinase: a role in virulence. In: Ayoub EM, Cassel GH, Branche WC, Henry TJ (eds) Microbiology determinants of virulence and host response. American Society of Microbiology, Washington, p.163-178, 1990.
- Rùchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia 20:233-244, 1982.
- Rùchel R, Uhlemann K, Böning B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abteilung Originale A 255:537-548, 1983.
- Samaranayake LP, Raeside JM, Mcfarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. Sabouraudia 22:201-207, 1984.

15. Shimizu MT. Fosfolipase em espécies de *Candida*. Revista de Microbiologia 20:338, 1989.
16. Souza EMB, Paula CR, Purchio A, Gambale W, Corrêa B, Cury AE. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade à antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. Revista de Microbiologia 21:247-253, 1990.
17. Van der Walt JP, Yarrow D. Methods for the maintenance, classification and identification of yeast. In: Kreger Van Rij NJW (eds) The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, p.45-104, 1984.
18. Williamson MI, Samaranayake LP, Mac Farlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. Journal Medical and Veterinary Mycology 24:415-417, 1986.
19. Yamamoto T, Nohara K, Uchida K, Yamaguchi H. Purification and characterization of secretory proteinase. Microbiology and Immunology 36:637-641, 1992.
20. Zegarelli D. Fungal infections of the oral cavity. Otolaryngologic Clinics of North America 26:1069-1088, 1993.