

# Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral

*Comparative study between extracellular phospholipase and proteinase production in clinically important of the genus Candida isolated in oral candidiasis patients*

Patrícia ANDREOLA<sup>a</sup>, Adriana DEMATHÉ<sup>a</sup>, Daniel GALAFASSI<sup>a</sup>, Estelamari Barbieri ELSEMANN<sup>a</sup>,  
Rogério Brasiliense ELSEMANN<sup>a</sup>, Alexandra Flávia GAZZONI<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>FSG – Faculdade da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS, Brasil

## Resumo

**Introdução:** A habilidade da *Candida* spp. em produzir enzimas proteolíticas, tais como fosfolipase e proteinases, tem um papel importante na patogenicidade destas leveduras. **Objetivo:** Determinar as espécies causadoras das infecções orais por *Candida* spp., além de investigar a atividade *in vitro* das fosfolipases e proteinases em isolados clínicos do gênero *Candida*, provenientes de pacientes com candidíase oral. **Material e método:** Isolados de *Candida* spp., pertencentes à Coleção de Cultivos Fúngicos do Laboratório de Microbiologia e Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha, foram analisados. Produção de fosfolipases foi analisada utilizando-se Ágar gema de ovo. Liberação de proteinases foi medida utilizando-se extrato de levedura adicionado à albumina bovina. **Resultado:** Um total de 35 isolados clínicos do gênero *Candida* foi testado. *C. albicans* foi a espécie predominante (77%). Os demais isolados identificados foram: *C. parapsilosis* (20%) e *C. tropicalis* (2%). Ao comparar a atividade de fosfolipase do grupo *C. albicans* com o grupo *Candida* não-*albicans*, foi encontrada diferença significativa ( $P=0,04$ ). Não foi encontrada diferença significativa entre a *C. albicans* e a *C. não-albicans*, para a produção de proteinase. A liberação de proteinase foi significativamente maior quando comparada à produção de fosfolipase para o gênero *Candida* ( $P=0,04$ ). Diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando a atividade de fosfolipase e proteinase da *C. albicans* foi comparada à atividade das espécies de *C. não-albicans* ( $P=0,02$ ). **Conclusão:** Diferentes quantificações de fosfolipase extracelular e atividade de proteinase têm sido atribuídas aos isolados clínicos de *C. albicans* quando comparados a outras espécies de *Candida*.

**Descritores:** Enzimas extracelulares; *Candida* spp.; fatores virulência.

## Abstract

**Introduction:** The ability of the genus *Candida* to produce secretory enzymes such as proteinase and phospholipases to play an important role in the pathogenicity of these yeasts. **Objective:** To determine the *Candida* species isolates from oral cavity infections and to investigate *in vitro* phospholipase and protease activities in clinically important of the genus *Candida* isolated in oral candidiasis patients. **Material and method:** *Candida* species isolated of the Fungal Culture Collection of Oral Microbiology and Pathology Testing Service Laboratory of the Dentistry Department of Faculdade da Serra Gaúcha were evaluated. The phospholipases detection was assayed using the egg yolk agar plate method. Determination of protease production was performed in agar plates containing bovine serum albumine and yeasts extract. **Result:** A total of 35 isolates of the genus *Candida* were tested. *C. albicans* was the species predominant (77% of isolates), followed by *C. parapsilosis* (20%) and *C. tropicalis* (2%). When compared the phospholipase activity of the *C. albicans* group with the non-*albicans Candida* species types group was observed significant difference among of this groups ( $P=0.04$ ). No statistically significant difference between the *C. albicans* and non-*albicans Candida* species types when was compared to proteinase production. Proteinase production was higher and statistically significant when compared to phospholipase activity in the genus *Candida* isolates ( $P=0.04$ ). Statistically significant differences were found between phospholipases and proteases activity for *C. albicans* when compared to non-*albicans Candida* species types ( $P=0.02$ ). **Conclusion:** Differences in the secretion rates of phospholipase extracellular and proteases activity have been attributed to clinical strains of *C. albicans* when compared to others *Candida* species types.

**Descriptors:** Extracellular enzymes; *Candida* spp.; virulence factors.

## INTRODUÇÃO

A Candidíase é a infecção fúngica mais comum da cavidade bucal. Entre as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie de maior importância odontológica, sendo que sua ocorrência neste sítio anatômico representa 20% a 60% de todos os isolados<sup>1,2</sup>. Assim, apresenta-se como um dos agentes patógenos mais importantes encontrados na cavidade oral<sup>3</sup>.

Apesar de a *C. albicans* ser a espécie mais comum isolada na cavidade bucal, a incidência das infecções provocadas por *C. não-albicans* tem se comportado de maneira crescente<sup>1</sup>. Dentre as espécies de *C. não-albicans* identificadas como importantes agentes etiológicos de infecções na cavidade oral, incluem-se: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, bem como *C. krusei*<sup>1-3</sup>.

Clinicamente, o gênero *Candida* é o agente causador de diferentes tipos de infecções na cavidade bucal<sup>2,3</sup>. Portanto, as manifestações clínicas da candidíase oral variam de agudas (pseudomembranosa e eritematosa) a crônicas (pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica). A queilite angular, a estomatite associada à prótese, bem como a glossite romboidal mediana, são consideradas formas menos frequentes da infecção<sup>4</sup>.

Os fatores de virulência expressados por este gênero fúngico contribuem para sua patogenicidade, uma vez que eles interferem na capacidade de aderência às células epiteliais, bem como em biomateriais<sup>1,2</sup>. Dentre os principais fatores de virulência encontrados na *Candida* spp., estão: a termotolerância; a presença de adesinas, as quais se destacam pela sua importância na adesão ao hospedeiro; a expressão de genes de resistência aos antifúngicos, bem como a produção de enzimas extracelulares, tais como fosfolipases, proteinases e hemolisinas<sup>3,5-7</sup>.

As fosfolipases pertencem a uma família de enzimas capazes de degradar diversos tipos de substratos fisiologicamente importantes, tais como componentes celulares das mucosas<sup>3</sup>. Estas enzimas extracelulares desempenham um papel importante na invasão dos tecidos, caracterizada pela desintegração das membranas epiteliais, fato que facilita a ancoragem da hifa para dentro do citoplasma da célula<sup>5,6,8</sup>. Igualmente às fosfolipases, a proteinase também está envolvida na habilidade dos microrganismos em penetrar nos tecidos do hospedeiro<sup>9,10</sup>. Entretanto, o mecanismo difere daquele das fosfolipases extracelulares, uma vez que as proteinases provocam a degradação de uma grande variedade de proteínas do hospedeiro, em especial daquelas relacionadas ao sistema imune, tais como imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e citocinas<sup>5,8,9</sup>.

Considerando-se que as espécies caracterizadas como produtoras de fosfolipases e proteinases estão associadas a um prognóstico desfavorável, bem como a hipótese de que o nível de produção de enzimas extracelulares (fosfolipases e proteinases) nas diferentes espécies de *Candida* spp. interfere na apresentação clínica desta infecção e que, principalmente, a resposta clínica frente ao tratamento antifúngico estabelecido pode não ser satisfatória, o presente estudo tem como objetivo identificar as espécies envolvidas, além de comparar o nível de produção de fosfolipases e proteinases a partir de isolados clínicos provenientes de pacientes com candidíase oral

na Clínica Odontológica da Faculdade da Serra Gaúcha, Região Sul do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODO

### Coleção dos Isolados

Este estudo foi conduzido a partir de 35 isolados clínicos da Coleção de Cultivos Fúngicos pertencente ao Departamento de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha.

As cepas clínicas foram mantidas em Agar Infusão Cérebro-Coração (BHI) (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) adicionado a glicerol (10%), a uma temperatura de 4 °C até o momento da identificação, bem como da determinação da atividade enzimática.

### Identificação

A identificação das espécies de *Candida* seguiu metodologia padronizada pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*), tais como: teste de tubo germinativo, morfologia da colônia em Ágar Sabouraud [Difco, (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)]. Também foi utilizado, neste estudo, o meio cromogênico de CHROMagar *Candida* (Difco-BD Diagnostic Systems, La Croueix, MD, France), para identificação das espécies, bem como para a diferenciação entre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. O CHROMagar *Candida* também foi utilizado para identificação de pacientes com infecções mistas, além de ser empregado para confirmação quanto ao manuseio de cultivos puros. Em adição a isso, todos os isolados clínicos do estudo foram confirmados pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR), principalmente quando o CHROMagar *Candida* apresentava-se com crescimento fúngico compatível com colônias brancas.

### Método de PCR

#### Extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Os isolados clínicos foram semeados em Sabouraud Dextrose Ágar (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) a 37 °C, por 24 horas. Para cada reação, foi utilizada uma colônia pura, a qual foi ressuspensa em uma solução de lise contendo 1,4 M NaCl, 50 mM KCl, 90 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (com pH 7,4). Para degradar completamente as leveduras, foram acrescentadas 125 U de liticase (L4276, Sigma, EUA). Esta solução foi incubada por 30 minutos (min) a 37 °C. Posteriormente, foi adicionada a proteinase K [25 a 50 µL de uma solução a 20 mg/mL (Promega, EUA)], bem como 100 µL de solução de extração (400 mM Tris-Cl, 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% dodecilsulfato de sódio). Em seguida, houve uma nova incubação por 12 horas, a 65 °C.

Para extração e purificação do DNA, foi utilizada a técnica de remoção de proteínas com fenol-clorofórmio. Para a precipitação, foi acrescentado, ao produto da reação, 1 mL de álcool isopropílico frio, seguido de etanol (75%) frio. Entre reação de precipitação com álcool isopropílico e etanol, foi feita uma lavagem a 14.000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, deixou-se o DNA livre secar em temperatura ambiente por 30 minutos e, posteriormente, foi ajustado a uma concentração de 0,25 a 1 mg/µL para amplificação.

## Amplificação da sequência ITS

Para a reação de PCR, foram utilizados *primers* específicos para seis espécies, que amplificam os genes ITS1 e ITS2 do RNAr, e o gene da topoisomerase II (Tabela 1)<sup>11-13</sup>.

A reação de PCR foi preparada em um volume de 50 µL, composto por solução tampão 10X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de *primer* (Invitrogen, EUA), 2U de Taq DNA polimerase (Promega, EUA) e 50 ng de DNA previamente extraído. A programação do PCR foi feita de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida ainda por mais uma extensão final de 8 minutos a 72 °C. Em cada ensaio, foi realizado um controle negativo, ao qual se adicionou água destilada estéril.

A análise por eletroforese dos produtos de PCR foi visualizada em gel de agarose a 1,7% adicionado a 1 µg/mL de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, USA). Os produtos de PCR foram avaliados conforme o tamanho dos pares de bases (pbs) de cada uma das bandas obtidas, em comparação com o tamanho esperado para cada espécie.

## Preparação do inóculo para análise enzimática

Para estimar a atividade das enzimas extracelulares deste estudo, as cepas clínicas foram reisoladas em Ágar Sabouraud-Cloranfenicol (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) e, então, reincubadas em estufa microbiológica a 37 °C por 24 horas, em aerobiose.

Para a determinação da atividade enzimática, uma suspensão de leveduras a 10<sup>7</sup> células/mL foi padronizada através da contagem em câmara de Neubauer (Kasvi, Padova, Itália). Uma alíquota de 10 µL foi semeada nos meios de cultivos correspondentes.

Cada isolado foi testado em duplicata. A atividade de fosfolipase e proteinase foi estabelecida pela média de quatro leituras de cada cepa clínica.

## Determinação da atividade fosfolipase

Para determinação da produção de fosfolipase, foi utilizado, como meio de cultivo, ágar gema de ovo (22,5 ágar malte, 29,2 g NaCl, 0,28 g CaCl<sub>2</sub>, dissolvidos em 490 mL de água destilada), conforme descrito por Polak<sup>9</sup> e Price et al.<sup>10</sup>. Logo após a semeadura, os cultivos foram incubados a 37 °C durante seis dias, em aerobiose. Findado o tempo de incubação, o diâmetro das colônias foi medido.

O escore de medição para produção dos níveis de fosfolipase foi categorizado da seguinte forma: Pz-1 (negativo); 0,35-0,5 (produtor alto); 0,51-0,74 (produtor moderado); e 0,75-0,9 (produtor leve).

## Determinação da atividade proteinase

Para quantificar a produção de proteinase, foi utilizado um meio de cultivo conforme descrito por Cassone et al.<sup>14</sup>. Tal meio de cultivo foi constituído da seguinte maneira: 11,7 g de YPN (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA), 0,1 g de extrato de levedura e 2 g de albumina bovina foram adicionados a 200 mL de água destilada. Esta solução foi esterilizada por filtração utilizando uma membrana porosa de 0,22 µm (Techno Plastic Products AG., Trasadingen, Suíça). Posteriormente, foi adicionada a esta constituição uma solução previamente autoclavada de 16 g de ágar bacteriológico (Difco-BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) dissolvida em 800 mL de água destilada.

Os cultivos foram incubados em aerobiose a 37 °C e, após seis dias de incubação, a atividade enzimática foi estabelecida por meio da medida da zona clara circundante.

O nível de liberação da proteinase de cada isolado clínico foi estabelecido pelo seguinte escore: não produtor - aquelas colônias que não apresentaram lise circundante visível; produtor moderado - aquelas colônias com um halo entre 1-2 mm de diâmetro; altamente produtor - aquelas colônias que apresentam tamanho de halo maior que 2 mm de diâmetro.

## Análise Estatística

Dados coletados foram analisados usando GraphPad 4.0 para Windows (GraphPad Software INC., La Jolla, CA). Para comparação entre os grupos, foi utilizado teste *T*'Student. Para todas as análises

**Tabela 1.** *Primers* específicos empregados para a identificação molecular das espécies do estudo

| Espécie                  | Nome               | Sequência 5'-3'   | Gen              | Pb* |
|--------------------------|--------------------|---|------------------|-----|
| <i>C. glabrata</i>       | CGBF35<br>CGBF103  | CCC AAA AAT GGC CGT AAG TAT G<br>ATA GTC GCT ACT AAT ATC ACA CC | Topoisomerase II | 674 |
| <i>C. dubliniensis</i>   | CDB28<br>CDBR110   | AAA TGG GTT TGG TGC CAA ATT A<br>GTT GGC ATT GGC AAT AGC TCT A  | Topoisomerase II | 816 |
| <i>C. guilliermondii</i> | CGKF 41<br>CGLR61  | CCC AAA ATC ACA AAG CTCAAG T<br>TAC GAC TTG AAG TTG GCA ATT G   | Topoisomerase II | 205 |
| <i>C. tropicalis</i>     | CTR1<br>CTR2       | CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T<br>TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T  | ITS 1 E ITS2     | 357 |
| <i>C. parapsilosis</i>   | -                  | TCCGTAGGTGAACCTGCGG   | ITS1             | 570 |
| <i>C. albicans</i>       | CALB1 F<br>CALB2 R | TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A ATC CCG<br>CCT TAC CAC TAC CG     | ITS1 e ITS2      | 273 |

\* Pb: pares de bases.

deste estudo, utilizou-se um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P \leq 0,05$ .

O presente trabalho foi realizado de acordo com a *Declaração de Helsinki* (2008), bem como em concordância com a legislação vigente (466/12) do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa e Conselho Nacional de Saúde (CONEP/CNS) e suas complementares. O referido trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade da Serra Gaúcha (CEP/FSG), sob CAAE n.º 48827015.7.0000.5668.

## RESULTADO

Determinação das espécies pelo CHROMagar *Candida*: houve predomínio da *C. albicans*, a qual foi identificada em 27 casos (77%). *C. tropicalis* foi identificada em um caso (2%).

### PCR para Discriminação das Espécies de *Candida* spp.

Os produtos de PCR, a partir da amplificação das regiões ITS1-5.8s-ITSII do DNA fúngico dos isolados clínicos deste estudo, apresentaram tamanhos que variaram de 320 a 560 pbs. As espécies identificadas como *C. albicans* (27 casos) e *C. parapsilosis* apresentaram tamanhos similares, que variaram entre 510 e 541 pbs, respectivamente. Assim, sete casos (20%) foram identificados molecularmente como sendo *C. parapsilosis*. O isolado clínico identificado como *C. tropicalis* produziu fragmentos de menor tamanho, correspondente a 324 pbs. Todos os isolados identificados como *C. albicans* e *C. tropicalis* pelo CHROMagar *Candida* foram confirmados pela técnica de PCR.

**Atividade de fosfolipase extracelular:** do total dos 35 isolados clínicos, dez cepas (29%) demonstraram atividade de liberação de fosfolipase extracelular.

No que diz respeito ao total de isolados clínicos de *C. albicans*, nove (33%) foram positivos para a produção de fosfolipase. Dentre estes, sete isolados (26%) foram identificados como produtores altos e duas cepas (8%) foram reconhecidas como produtoras moderadas. O restante dos isolados identificados como *C. albicans* - 18 (66%) - foi reconhecido como produtores negativos.

Um número reduzido de isolados clínicos reconhecidos como *C. não-albicans* foi hábil em produzir fosfolipase. Dentre os oito isolados (22%) de *C. não-albicans*, um isolado clínico (13%) de *C. parapsilosis* foi produtor alto e seis (75%) foram produtores

negativos. O único isolado de *C. tropicalis* foi identificado como produtor negativo.

A atividade de fosfolipase do gênero *Candida* apresentou um valor médio de 0,28 (0,10-0,60;  $\pm 0,12$ ). No que diz respeito à atividade de fosfolipase na *C. albicans*, a média obtida foi de 0,30 (0,10-0,60;  $\pm 0,12$ ), enquanto que, no grupo de *C. não-albicans*, a média foi menor e igual a 0,21 (0,10-0,35;  $\pm 0,10$ ). Quando a atividade de fosfolipase do grupo *C. albicans* foi comparada com o grupo de *Candida não-albicans*, observou-se uma diferença significativa entre os grupos ( $P=0,04$ ). A correspondência entre a distribuição das frequências, das médias e do desvio padrão (dp) da produção de fosfolipases e proteinases das espécies de *Candida* spp. identificadas no estudo está demonstrada na Tabela 2.

**Produção de proteinases:** do total de 35 isolados clínicos de *Candida* spp., 34 (97%) apresentaram atividade enzimática para a proteinase.

Dentre os 27 isolados identificados como *C. albicans*, 26 (97%) foram positivos para a liberação de proteinase. Dentre estes, 19 (70%) foram produtores altos, sete (26%) foram produtores moderados e um (4%) foi considerado como não produtor.

No que diz respeito à determinação da proteinase entre as espécies de *Candida não-albicans*, dentre os sete isolados (88%) de *C. parapsilosis*, todos (100%) foram positivos para atividade de proteinase, sendo que quatro isolados (57%) foram produtores altos e três (43%) foram produtores moderados. O único isolado clínico identificado como *C. tropicalis* foi considerado como produtor moderado.

A produção de proteinase do gênero *Candida* revelou um valor médio igual a 0,35 (0,10-0,60;  $\pm 0,14$ ). No que diz respeito à liberação de proteinase na *C. albicans*, a média deste grupo foi 0,36 (0,20-0,60;  $\pm 0,14$ ). Já no grupo de *C. não-albicans*, a média foi igual a 0,30 (0,10-0,60;  $\pm 0,16$ ). Não se encontrou diferença significativa quando foram comparados os grupos de *C. albicans* e *C. não-albicans* para produção de proteinase ( $P=0,31$ ).

**Produção de proteinase × liberação de fosfolipases extracelulares:** a produção de proteinase foi significativamente maior quando comparada à liberação de fosfolipase em isolados do gênero *Candida*. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa entre os grupos estudados ( $P=0,04$ ).

**Tabela 2.** Produção de enzimas extracelulares de isolados clínicos de *Candida* spp. identificados em pacientes com candidíase oral (N=35)

| Micro-organismo        | N  | Fosfolipase (37 °C) |    |                              | Cepas Proteinases positivas |     |                              |
|------------------------|----|---------------------|----|------------------------------|-----------------------------|-----|------------------------------|
|                        |    | +                   | %  | $\bar{x}^*(Pz \pm dp)$       | +                           | %   | $\bar{x}^*(Pz \pm dp)$       |
| <i>Gênero Candida</i>  | 35 | 10                  | 29 | 0,28 (0,10-0,60 $\pm 0,12$ ) | 34                          | 97  | 0,35 (0,10-0,60 $\pm 0,14$ ) |
| <i>C. albicans</i>     | 27 | 9                   | 33 | 0,30 (0,10-0,60 $\pm 0,12$ ) | 26                          | 97  | 0,36 (0,20-0,60 $\pm 0,14$ ) |
| <i>C. parapsilosis</i> | 7  | 1                   | 13 | 0,21 (0,10-0,35 $\pm 0,10$ ) | 7                           | 100 | 0,30 (0,10-0,60 $\pm 0,16$ ) |
| <i>C. tropicalis</i>   | 1  | -                   | -  | 0,3                          | 1                           | 100 | 0,2-                         |

\* Cada isolado foi testado em duplicata. A atividade de fosfolipase e proteinase foi estabelecida pela média de quatro leituras de cada cepa clínica.

No que diz respeito à comparação da liberação de proteinase com a produção de fosfolipase da *C. albicans*, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos grupos estudados ( $P=0,13$ ).

Quando comparados os isolados de *Candida* não-*albicans* com respeito à produção de enzimas extracelulares (fosfolipase e proteinase), não foi observada diferença significativa entre os grupos do estudo ( $P=0,18$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os isolados clínicos reconhecidos como *C. parapsilosis* em relação à produção de proteinase e fosfolipase ( $P=0,32$ ). A comparação entre a atividade de proteinase e fosfolipase para *C. tropicalis* não foi possível, visto que somente foi identificado um isolado clínico.

O Teste de ANOVA One-way foi significativo quando a atividade de fosfolipases e proteinase da *C. albicans* foi comparada às atividades de fosfolipases e proteinase das espécies de *C. não-albicans* ( $P=0,02$ ). Os resultados da comparação entre os grupos estão mostrados na Figura 1.

## DISCUSSÃO

A produção de enzimas extracelulares é, particularmente, considerada como o maior fator de virulência para o desenvolvimento das infecções oportunistas, em especial na candidíase oral<sup>15,7,9</sup>. Entre as espécies fúngicas oportunistas também consideradas como produtoras de enzimas hidrolíticas, estão *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia furfur* e *Rhodotorula rubra*<sup>15-18</sup>. No entanto, há poucos estudos que investigam o comportamento da virulência entre estas espécies de leveduras. O presente estudo tem

focalizado na atividade de fosfolipase e proteinases extracelulares em diferentes espécies de *Candida* isoladas a partir de sítios bucais em pacientes com infecções ativas pela levedura.

Em nossa casuística, o perfil de prevalência das espécies de *Candida* spp. encontrado foi semelhante a outros estudos anteriormente publicados na literatura mundial<sup>1,3,8</sup>. A *C. albicans* foi a espécie causadora de candidíase oral mais prevalente em nosso estudo, apresentando uma taxa de prevalência de aproximadamente 77%, resultado este que concorda com os estudos de Thiele et al.<sup>18</sup> e Marco-Arias et al.<sup>3</sup>, os quais realizaram estudos sobre a prevalência da *C. albicans* em estomatite protética na região sul da América do Sul e na Europa, encontrando uma taxa próxima a 60%. Em adição a isso, nosso estudo também identificou pacientes portadores de candidíase oral provocada por espécies de *C. não-albicans*, sendo a mais prevalente, neste grupo, a *C. parapsilosis*, seguida da *C. tropicalis*. É digno de nota que a *C. parapsilosis* é a espécie mais emergente nas candidemias<sup>19-20</sup>. Assim, sua prevalência vem aumentando consideravelmente em ambientes hospitalares, diminuindo a sobrevivência de pacientes críticos internados em Unidades de Tratamento Intensivo Adulta e Pediátrica<sup>21</sup>. Este fato deve-se à sua associação com a nutrição parenteral, os cateteres de diálise peritoneal e o uso de cateter venoso central. Além disso, as mãos de profissionais da saúde são consideradas fontes ambientais predominantes e, assim, a *C. parapsilosis* é cada vez mais responsável por surtos hospitalares<sup>20,21</sup>.

De acordo com dados provenientes de estudos experimentais, tem se demonstrado que a elevada produção de fosfolipases e proteinases melhora a capacidade do micro-organismo em colonizar e penetrar nos tecidos e, com isso, evadir-se do sistema imune

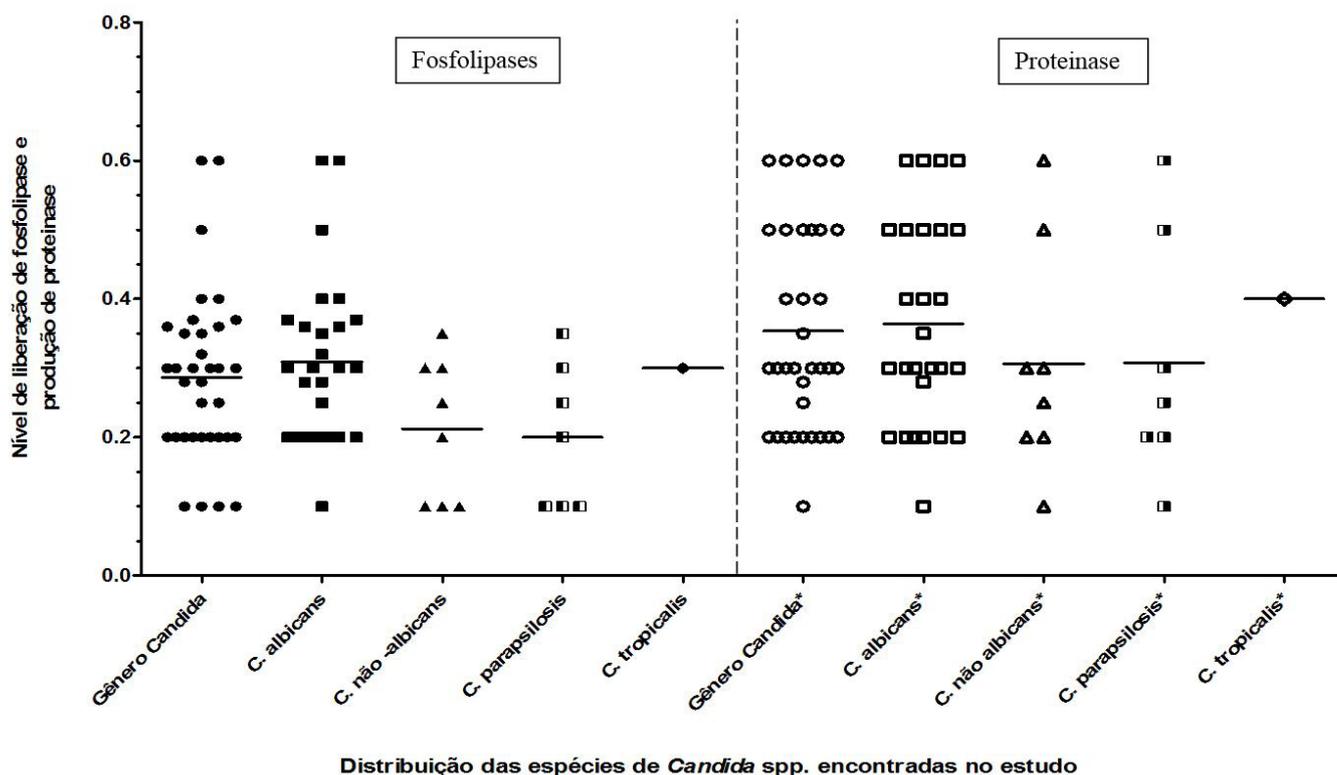


Figura 1. Comparação entre a liberação de enzimas extracelulares do gênero *Candida* spp. em isolados clínicos do estudo ( $N=35$ ). \* A escala foi transformada de milímetro (mm) para centímetro (cm).

do hospedeiro<sup>22</sup>. Nossos resultados mostram uma atividade de fosfolipase para o gênero *Candida*, isolado a partir de infecções ativas de cavidade oral, com positividade de 29% entre as cepas testadas. Em um estudo publicado por Mohaan et al.<sup>22</sup>, os mesmos encontraram uma alta atividade fosfolipásica em isolados clínicos sanguíneos. Os estudos de Kadir et al.<sup>23</sup> e Thiele et al.<sup>18</sup> também relataram uma significativa atividade de fosfolipase, porém estes isolados foram provenientes de estomatites protéticas. A explicação para estas diferenças percentuais encontradas é a localização do sítio anatômico em que foram detectadas.

A *C. albicans* apresentou 33% dos isolados positivos para atividade de fosfolipase. Em contrapartida, a positividade da fosfolipase foi encontrada em somente 3% das espécies de *C. não-albicans*. Igualmente aos nossos resultados, outros estudos também relatam que os isolados de *C. albicans* produzem significativamente mais atividade da enzima extracelular do que as espécies de *C. não-albicans*<sup>3,5,6,24</sup>. O fato de termos detectado a produção de fosfolipase em maior quantidade pelas cepas pertencentes à espécie *C. albicans* corrobora os resultados descritos por Samaranyake et al.<sup>25</sup>, que também estudaram a atividade fosfolipásica do gênero *Candida* e observaram que este tipo de enzima era produzido por *C. albicans* e não por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Em concordância com o nosso estudo, Marco-Arias et al.<sup>3</sup> também encontraram, em seus relatos, que as espécies reportadas como *C. não-albicans* não são produtoras de fosfolipase. Entretanto, Galan-Landero et al.<sup>26</sup> reporta que isolados clínicos de *C. tropicalis* são produtores de fosfolipases extracelulares. Nosso estudo suporta parcialmente os resultados encontrados por Shimizu<sup>8</sup>, que demonstrou que, além de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, os cultivos de *C. tropicalis* também evidenciaram atividade de fosfolipase; tal atividade, porém, deu-se em diferentes percentuais. Nós, aqui, não observamos esta atividade fosfolipásica no isolado estudado. Esta discrepância deve-se à variação intraespécies e à diferença metodológica usada para detectar a atividade das fosfolipases.

Quando comparamos a produção de proteinase, verificou-se que, no gênero *Candida*, 97% dos isolados foram produtores positivos. Assim, nosso estudo afirma que a proteinase é um importante fator de virulência, sendo secretada tanto pelas espécies *non-albicans* das leveduras - tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* - como pela *C. albicans*. Nossos resultados reafirmam aqueles encontrados pelo estudo de Yamamoto et al.<sup>27</sup>, no qual 13 de 18 cepas de *C. tropicalis* e 11 de 18 cepas de *C. parapsilosis* apresentaram-se como altamente proteolíticas, uma vez que, em nosso estudo, os isolados clínicos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também se apresentaram como altamente proteolíticos.

A compreensão sobre os fatores de virulência de alguns agentes infecciosos fúngicos é, por ora, limitada<sup>15,16</sup>. Em nosso

estudo, quando comparamos o gênero *Candida* para produção de proteinase e fosfolipase, notou-se uma diferença significativa, demonstrando que o gênero *Candida* produz proteinase em maior grau quando comparado à produção de fosfolipase. Esta diferença significativa encontrada deve-se ao fato de isolarmos cepas clínicas provenientes de infecções ativas de cavidade oral, as quais se apresentaram como altamente produtoras de proteinase. Segundo Serda Kantarcioglu<sup>24</sup>, 56 de 60 cepas de *C. albicans* e duas de quatro cepas de *C. kefir* testadas produziram tanto fosfolipase quanto proteinase, simultaneamente. Em nosso estudo, foi encontrado um percentual simultâneo de produção de fosfolipase e proteinase de 54%. Quando comparamos a liberação das enzimas extracelulares (fosfolipases e proteinases) nos isolados identificados como *C. albicans* e *C. não-albicans*, nosso estudo identificou diferenças significativas entre estes grupos, demonstrando que os percentuais de enzimas extracelulares liberadas em ambos os grupos são distintos. De fato, há poucos estudos que comparam a atividade de fosfolipase e proteinase, simultaneamente<sup>27</sup>.

A incidência de *C. não-albicans* tem aumentado muito nos últimos anos<sup>16,18</sup>. Embora muitos relatos descrevam casos de infecções por espécies *non-albicans* em sítios infecciosos orais<sup>21</sup>, estudos apresentam resultados controversos para estabelecer relação entre a patogenicidade das espécies e a produção de enzimas extracelulares<sup>8,25,26</sup>. Vale ressaltar que o número de isolados clínicos identificados como *C. não-albicans*, neste estudo, foi limitado, um dado já esperado, uma vez que as infecções orais provocadas por *C. não-albicans* são menos comuns quando comparadas à prevalência de infecções orais provocadas por *C. albicans*, já que esta se comporta como a espécie mais comum na cavidade oral<sup>3,4</sup>.

## CONCLUSÃO

Em resumo, dos isolados testados observou-se uma maior prevalência de *C. albicans*. No gênero *Candida*, houve maior produção de proteinase quando comparada à atividade de fosfolipase. Os isolados clínicos pertencentes ao grupo *C. albicans* apresentaram uma significativa maior produção de fosfolipase e proteinase quando foram comparados com os isolados clínicos do grupo de espécies reconhecidas como *C. não-albicans*.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Departamento de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha.

Este trabalho teve o apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Número do processo: 482025/2011-2).

## REFERÊNCIAS

1. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5590-6. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00466-11>. PMID:21930869.
2. Hernández-Solís SE, Reuda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(2):137-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003>. PMID:24071641.

3. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. 2011 Jul;54(4):e10-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01812.x>. PMID:20028461.
4. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez M-G, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014 Dec;6(5):e576-82. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51798>. PMID:25674329.
5. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006 Apr;161(4):219-23. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-005-0001-x>. PMID:16552484.
6. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture Stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul;98(1):53-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2003.04.002>. PMID:15243471.
7. Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Nov;29(9):660-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.06.009>. PMID:21899928.
8. Shimizu MT. Fosfolipase em espécies de *Candida*. *Rev Microbiol*. 1989;20:338.
9. Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*. 1992 Jan-Feb;35(1-2):9-16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1992.tb00813.x>. PMID:1406791.
10. Price ME, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Mar;20(1):7-14. <http://dx.doi.org/10.1080/00362178285380031>. PMID:7038928.
11. Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A. PCR-based identification on for pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*. 2002 Aug;19(11):973-89. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.892>. PMID:12125054.
12. Luo G, Mitchell TC. Rapid identification of pathogene fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Aug;40(8):2860-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002>. PMID:12149343.
13. Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MH, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. The identification and differentiation of the *Candida parapsilosis* complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Apr;111(4):267-70. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150466>. PMID:27074256.
14. Cassone A, Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis*. 1987 Nov;156(5):777-83. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/156.5.777>. PMID:3309073.
15. Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1996-1997;136(3):119-23. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00438916>. PMID:9276940.
16. Riciputo RM, Oliveri S, Micali G, Sapuppo A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses*. 1996 May-Jun;39(5-6):233-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00131.x>. PMID:8909036.
17. Mayser P, Laabs S, Heuer KU, Gründer K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia*. 1996;135(3):149-55. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00632336>. PMID:9066156.
18. Thiele MC, Carvalho AP, Gursky LC, Rosa RT, Samaranyake LP, Rosa EA. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. *Gerodontology*. 2008 Dec;25(4):229-36. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-2358.2008.00221.x>. PMID:18312370.
19. Santolaya ME, Queiroz Telles F, Alvarado Matute T, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, et al. Recommendations for the management of candidemia in children in Latin America. *Rev Iberoam Micol*. 2013 Jul-Sep;30(3 Suppl 1):171-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.011>. PMID:23764558.
20. Santolaya ME, Alvarado Matute T, Queiroz Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, et al. Recomendaciones para el manejo de la candidemia en neonatos en América Latina. *Rev Iberoam Micol*. 2013 Jul-Sep;30(3):158-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.002>.
21. Horasan ES, Ersöz G, Göksu M, Otag F, Kurt AO, Karaçorlu S, et al. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6 years study. *Mycopathologia*. 2010 Oct;170(4):263-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-010-9322-5>. PMID:20524154.
22. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol*. 2008 Dec;25(4):208-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70050-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70050-0). PMID:19071887.
23. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil*. 2002 May;29(5):452-7. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2842.2002.00837.x>. PMID:12028493.
24. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002 Jun;45(5-6):160-5. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x>. PMID:12100532.
25. Samaranyake LP, Raeside JM, Mcfarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia*. 1984;22(3):201-7. <http://dx.doi.org/10.1080/00362178485380331>. PMID:6379916.
26. Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristan B, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol*. 2010 Feb;48(1):207-10. <http://dx.doi.org/10.3109/13693780902801242>. PMID:19274599.
27. Yamamoto T, Nohara K, Uchida K, Yamaguchi K. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 1992;36(6):637-41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02064.x>. PMID:1522813.

## CONFLITOS DE INTERESSE

---

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## \*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

---

Alexandra Flávia Gazzoni, Departamento de Odontologia, Faculdade da Serra Gaúcha, Rua Os Dezoito do Forte, 2366, São Pelegrino, 95020-472 Caxias do Sul - RS, Brasil, e-mail: alexandra.gazzoni@fsg.br

Recebido: Novembro 16, 2015

Aprovado: Junho 6, 2016