

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO CÁLCIO NO ENSAIO DE PLACA DA FOSFOLIPASE C

Rafael Stanisce M. dos Santos¹, Adolfo J. da Mota² e Francisco G. da Nóbrega³

1, 2, 3 - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-000 – São José dos Campos-SP.
e-mail: rafaelstms@msn.com; adolfo.mot@gmail.com.br; fgdnobre@univap.br

Resumo- *Cândida spp* são considerados fungos oportunistas de baixa virulência que estabelecem uma relação comensal com o hospedeiro e cujo mecanismo de patogênese ainda permanece por ser esclarecido. A capacidade de mudar da forma de levedura para a filamentosa, crescer bem em 37°C, e secretar enzimas hidrolíticas são apontados como possíveis fatores de virulência. A fosfolipase C, uma enzima secretada capaz de metabolizar lecitina, vem sendo apontada como um importante fator de virulência porque algumas amostras que não a secretam são avirulentos. Um teste de placa desenvolvido por Price *et al.* (1982) e modificado por Samaranayake *et al.* (1984) é aceito e largamente utilizado por vários centros de pesquisa para identificação de amostras produtoras de fosfolipase C. Neste trabalho investigamos se a formação do halo em torno das colônias produtoras da fosfolipase C depende da presença do cloreto de cálcio, como sugere o trabalho original. Concluimos que a formação do halo independe da presença de cloreto de cálcio.

Palavras-chave: *Cândida spp*, fosfolipase C, virulência.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Candida spp, mais prevalentemente *C. albicans*, são capazes de desenvolver infecções subcutâneas e disseminadas, sendo classificadas como micoses oportunistas (KONEMAN *et al.*, 2001). Essa característica sugere um sistema eficiente de adaptação a mudanças ambientais como local de corpo a ser colonizado, fisiologia do hospedeiro, resposta imune e terapia medicamentosa (SOLL, 2002). Os mecanismos envolvidos nessa “adaptação” começam a ser esclarecidos, havendo um consenso na literatura, baseado em dados experimentais, *in vitro* e *in vivo*, que algumas características estão envolvidas, sendo elas, adesão ao epitélio do hospedeiro, produção e secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas, capacidade de crescer em 37° C e a secreção de toxinas (YANG, 2003); (BISWAS; DIJCK; DATTAL, 2007); (NIWERTH; KORTING, 2000).

Entre as enzimas hidrolíticas secretadas as fosfolipases estão entre as mais bem estudadas. Os estudos concentram-se principalmente em *C. albicans*, e já identificaram uma família que compreende as fosfolipases A, B, C, D, lisofosfolipase e lisofosfolipase-transacilase (NIWERTH; KORTING, 2000); (YANG, 2003). Essas enzimas metabolizam fosfolípidios, os principais componentes das membranas celulares. Assim, além de estarem relacionadas à invasão do tecido do hospedeiro, essas enzimas participam do controle de crescimento e remodelamento da membrana celular do fungo, bem como na

transdução de sinais (NIWERTH; KORTING, 2000).

Diferentes metodologias empregadas para tentar esclarecer o papel da fosfolipase extracelular na patogenicidade de *C. albicans* têm demonstrado que isolados obtidos a partir de sangue produzem uma atividade extracelular de fosfolipase significativamente maior do que isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis e essa relação é igualmente observada entre linhagens invasivas e não invasivas. Infecção em modelo murino com linhagens que produzem mais ou menos fosfolipase mostrou que as que produziam mais fosfolipase eram mais virulentas, sugerindo assim, que a produção de fosfolipase pode ser um fator de virulência (NIWERTH; KORTING, 2000); (YANG, 2003).

O método mais utilizado para o teste da fosfolipase C, foi descrito inicialmente por Price, Wilkinson e Gentry (1982) e modificado por Samaranayake, Raeside e Macfarlane (1984). O ensaio consiste em um teste de placa cuja formação de um halo opaco em torno da colônia indica que esta secreta a fosfolipase C. Neste trabalho investigamos se a formação do halo em torno das colônias, supostamente produtoras da fosfolipase C, depende da presença do cloreto de cálcio, como sugere o trabalho original.

Material e Métodos

As espécies do gênero *Candida* e as respectivas linhagens usadas nesse trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies e linhagens usadas neste trabalho:

Espécie	linhagem
<i>Candida albicans</i>	FCF 14
	FCF 14,1
	ATCC 10231
	LGMG 1H
<i>Candida krusei</i>	ATCC 34135
<i>Candida tropicalis</i>	FCF 426
<i>Candida dubliniensis</i>	CD 33

Meio para identificação da fosfolipase:

inicialmente foi preparada uma emulsão com a gema do ovo e solução fisiológica 0,9% estéreis. Separadamente, foram preparados os seguintes meios:

Meio 1 com CaCl₂: 1% Peptona; 2% Dextrose; 1M Cloreto de sódio; 0,05M Cloreto de cálcio.

Meio 2 sem CaCl₂: 1% Peptona; 2% Dextrose; 1M Cloreto de sódio.

Meio 3 sem CaCl₂ com EGTA: 1% Peptona; 2% Dextrose; 1M Cloreto de sódio; 0,05M EGTA.

Nos meios foram adicionados 2% de agar, e esterilizado em autoclave.

Depois da esterilização, os meios foram resfriados em banho Maria (Marconi) 50 °C. Foi adicionado a estes meio, 10% da emulsão de ovo. A mistura foi homogeneizada e colocadas em placas de petri estéreis.

As linhagens testadas foram inicialmente cultivadas em meio rico (YPD - Yeast Extract 1%; peptona 2% e dextrose 2%) a 30°C por 24h sendo em seguida repicadas nos meios a serem testados com auxílio de uma alça calibrada de 1µL, as placas foram incubadas na estufa a 37 °C por 72 horas, decorrido o tempo de incubação, as três placas foram fotografadas (Sony DSC-P73).

O halo em torno das colônias é usado para medir a atividade enzimática, trata-se de uma medida indireta onde é calculada a razão Pz entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de precipitação. Valores Pz menores que 1 sugerem resultados positivos, linhagens produtoras de fosfolipase C e iguais a 1 são resultados negativos, linhagens não produtoras de fosfolipase C.

Resultados

A Figura 1 mostra o resultado do teste realizado conforme descrito no trabalho original. As Figuras 2 e 3 mostram os resultados dos meios modificados.

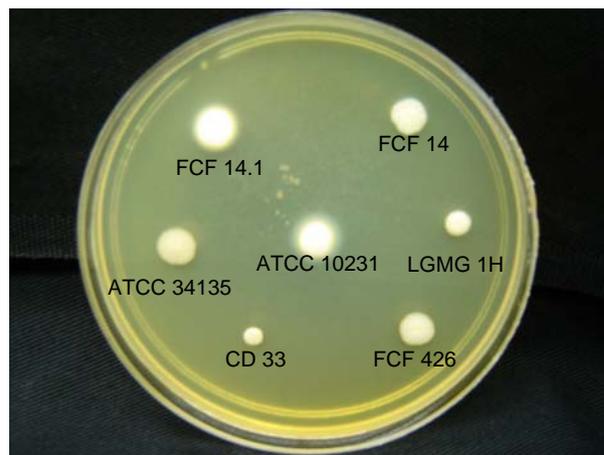


Figura 1 – ensaio da fosfolipase com cloreto de cálcio 72 horas

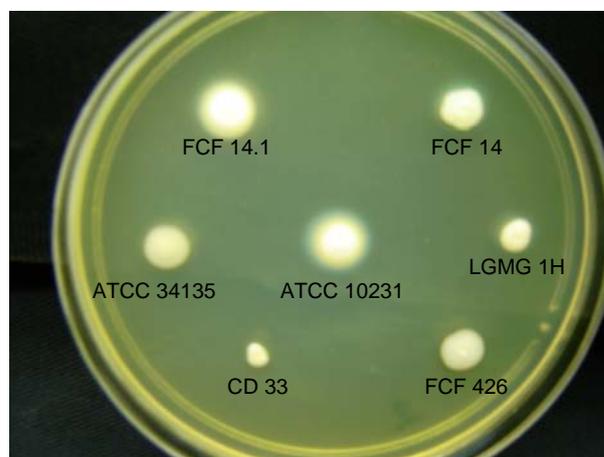


Figura 2 – ensaio da fosfolipase sem cloreto de cálcio 72 horas

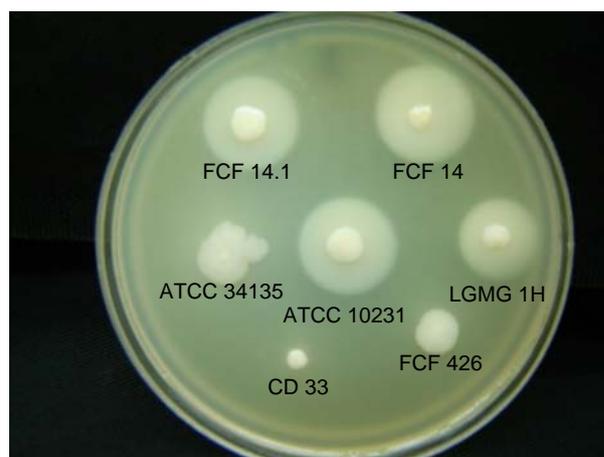


Figura 3 – ensaio da fosfolipase sem cloreto de cálcio e com EGTA 72 horas

Discussão

No trabalho original que estabeleceu a metodologia do ensaio em placa da fosfolipase C, Price, Wilkinson e Gentry (1982), sugerem que a formação da zona de precipitação em torno da colônia é resultante da interação do cálcio com os produtos de hidrólise dos fosfolípidios catalisada pela fosfolipase C. Os autores citam ainda, que a atividade em placa foi confirmada por testes bioquímicos. Entretanto, há no gráfico que correlaciona atividade enzimática e formação do halo duas amostras cuja atividade enzimática foi detectada pelo teste bioquímico sem terem, contudo formado o halo. Samaranyake, Raeside e Macfarlane (1984), demonstraram que período de incubação, pH, variação qualitativa no material, como a gema de ovo e diferentes açúcares presentes no meio podem interferir no resultado final do ensaio.

Como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, há formação do halo mesmo quando o cálcio não é adicionado ao meio, havendo também uma certa semelhança entre o diâmetro da colônia, o diâmetro do halo e o tempo necessário para que esse halo aparecesse, em média 72h. No meio onde provavelmente o cálcio estava seqüestrado pelo EGTA (Figura 3), a formação do halo foi mais evidente, aparecendo também na linhagem LGMG 1H, sendo o tempo necessário para sua observação de aproximadamente 16h.

Estes resultados não estão em concordância com os trabalhos de Price, Wilkinson e Gentry (1982), e Samaranyake, Raeside e Macfarlane (1984), pois estes sugerem que a presença de cálcio está diretamente relacionada com a formação do halo. A discrepância entre os resultados esperados, com base na literatura e os efetivamente obtidos no presente trabalho, pode estar relacionada com uma baixa sensibilidade do teste em medir a atividade enzimática, uma vez que essa medida é indireta, ou até mesmo, um viés metodológico, sendo a formação do halo resultado de uma outra atividade enzimática que não a da fosfolipase C. Para esclarecer essa discordância, mais estudos se fazem necessários, preferivelmente com base em ensaios bioquímicos bem estabelecidos e inequívocos.

Conclusão

A formação do halo em torno das colônias ocorreu mesmo quando o cálcio não foi adicionado ao meio ou quando foi usado um seqüestrador específico do cálcio, sugerindo que seu papel neste ensaio é irrelevante.

Referências

- BISWAS, S., DIJCK, P.V., DATTAI, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, p. 348–376, 2007.
- KONEMAN, E. W., et al. **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465 pp.
- NIEWERTH, M., KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**. v. 44, p. 361-367, 2001.
- PRICE, M. F; WILKINSON, I.D; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. 20, 7-14, 1982.
- SAMARANAYAKE, L.P; RAESIDE, J.M; MACFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**. 22, 201-207, 1984.
- SOLL, D. R., PUJOL, C. *Candida albicans* clades. **FEMS Immunol. Medical Microbiol**. v. 39, p. 1-7, 2003.
- SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**. v. 81, p.101-110, 2002.
- YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** v.36, p.223-228, 1998.