

AValiação DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA EXPRESSO PELA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DE AMOSTRAS HOSPITALARES

SANTOS, A.U.G.¹, TEODORO, G.R.¹, MARIA, A.², KHOURI, S.¹

¹ Universidade do Vale do Paraíba – Faculdade de Ciências da Saúde/Lab. de Microbiologia, Av. Shishima Hifumi, 2911, Bloco 04, São José dos Campos – S.P

² Instituto Adolfo Lutz – Regional I / Seção de Biologia Médica Taubaté – SP
adrianauchimura@gmail.com

RESUMO – A candidíase é considerada a principal infecção fúngica oportunista em seres humanos e a espécie mais comum é a *Candida albicans*, porém, outras espécies identificadas vêm aumentando consideravelmente, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, entre outras. A produção de toxinas e enzimas extracelulares constitui um dos fatores mais importantes para o desencadeamento de infecções pelo gênero *Candida*. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a produção de fosfolipase e proteinase em amostras clínicas de leveduras isoladas de pacientes hospitalizados, bem como classificar a atividade enzimática de cada isolado. Foram estudadas 105 amostras de pacientes de um Hospital Universitário da região do Vale do Paraíba. Dentre as espécies estudadas, a mais freqüente foi *Candida albicans* (38,1%). Quanto à pesquisa para atividade proteolítica, 52,39% apresentaram índice 2 (positiva) e 21,9% para índice 3 (fortemente positiva) e para a atividade fosfolipásica, 12,38% apresentaram índice 2 e 29,52% para índice 3, demonstrando assim, que os isolados apresentaram altos índices de atividade enzimática e provavelmente se relacionem com a patogenicidade do isolado.

Palavras-chave: Fatores de virulência, *Candida*, infecção hospitalar

Área do conhecimento: Microbiologia

Introdução

A candidíase, principal infecção fúngica oportunista do ser humano, é provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota endógena do corpo humano (MENEZES et al., 2004). Sua ampla variedade de apresentação e a sua significância clínica têm estimulado o interesse no estudo dos mecanismos de patogenicidade das espécies de *Candida* e na identificação de seus fatores de virulência (LACAZ et al., 2002; PENHA et al., 2000; ZAITZ et al., 1998).

Vários mecanismos são sugestivos da virulência tal como: capacidade de assumir várias formas, chamadas de variações adaptáveis; habilidade da forma de hifas; capacidade de aderir as mucosas superficiais; produção de enzimas hidrolíticas; proteinases que hidrolisam peptídeos (HUBE, 1998) e fosfolipases que hidrolisam fosfolipídeos (IBRAHIM et al., 1995).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção, variando conforme a amostra. Essa enzima localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua pela hidrólise dos fosfolipídeos, dando origem aos lisofosfolipídeos que causam dano à célula epitelial (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

A enzima proteinase produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular (HATTORI et al., 1981; KAMINISHI et al., 1986; RUCHEL et al., 1992). Sendo assim, o presente estudo visa contribuir, através da pesquisa de enzimas extracelulares expressas por diferentes espécies de *Candida*, para o melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade dessas leveduras isoladas de amostras hospitalares de casos de colonização e/ou infecção.

Metodologia

Foram estudadas 105 amostras clínicas de pacientes internados de um Hospital Universitário, da cidade de Taubaté, do estado de São Paulo, no Laboratório de Micologia do IAL-Taubaté e Microbiologia, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade do Vale do Paraíba. Sendo estas amostras, cedidas pela Profa. MSc Sônia Khouri Crosariol.

As amostras foram semeadas, primeiramente, em meio Chromagar® para verificar sua pureza. Estando puras, as amostras foram semeadas em

placas de Petri descartáveis contendo ágar Sabouraud-dextrose pela técnica de esgotamento e incubadas à 37°C. As colônias isoladas foram semeadas em tubos inclinados contendo ágar Sabouraud-dextrose e incubados à 37°C. As cepas foram submetidas à pesquisa de enzimas proteinases e fosfolipases.

A produção de proteinase foi verificada segundo Rùchel et al., (1982).

A produção de fosfolipase foi verificada segundo Price et al., (1982).

Os testes foram realizados empregando a cepa-padrão de *Candida albicans* (ICB-12A) como controle positivo. A atividade enzimática (Pz) foi mediada segundo Price et al. (1982), utilizando a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz=dc/dcp$. Os resultados de Pz foram considerados da seguinte maneira: (1) negativa ($PZ=1$), (2) positiva ($PZ \geq 0,64 < 1,0$) e (3) fortemente positiva ($PZ < 0,64$).

Resultados

Para a verificação quanto à produção de enzimas proteinase e fosfolipase, houve uma produção de um halo de degradação ao redor da colônia para proteinase e um halo de precipitação ao redor da colônia para fosfolipase, conforme mostra a foto 1.

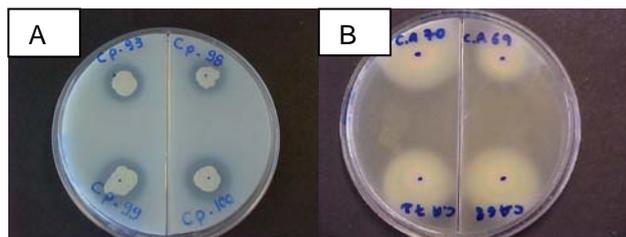


Foto 1 – (A) Teste de atividade enzimática para proteinase. (B) Teste de atividade enzimática para fosfolipase.

Quanto à pesquisa da atividade enzimática para a atividade proteolítica, 25,71% apresentaram atividade negativa (1), 52,39% atividade positiva (2) e 21,90% atividade fortemente positiva (3), conforme mostra o gráfico 1.

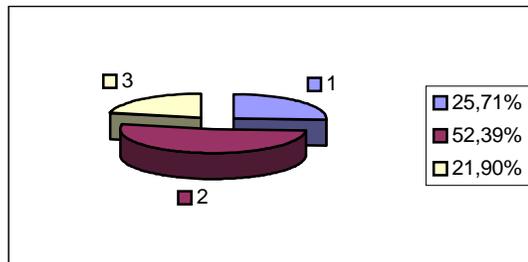


Gráfico 1 – Frequência de índice enzimático de proteinase em amostras de *Candida* isoladas de amostras hospitalares de pacientes internados em um hospital universitário em Taubaté, São Paulo (2002-2003).

Quanto à pesquisa da atividade enzimática para a atividade fosfolipásica, 58,10% apresentaram atividade negativa (1), 12,38% atividade positiva (2) e 29,52% atividade fortemente positiva (3), conforme mostra o gráfico 2.

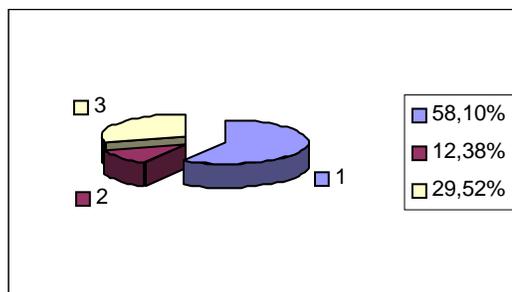


Gráfico 2 - Frequência de índice enzimático de fosfolipase em amostras de *Candida* isoladas de amostras hospitalares de pacientes internados em um hospital universitário em Taubaté, São Paulo (2002-2003).

A tabela 1 mostra a distribuição enzimática para proteinase em relação a infecção hospitalar (I.H.) e colonização (C) por espécies de leveduras. Pode-se observar que, 23,82% das espécies em situação de infecção hospitalar são positivas para proteinase e 50,47% das espécies em situação de colonização são positivas para proteinase.

Tabela 1 – Atividade proteolítica apresentada por amostras de leveduras isoladas em situação de infecção hospitalar e colonização.

Espécies de leveduras	Índice de atividade de proteinase						Total
	Pz=1 n(%)		Pz=2 n(%)		Pz=3 n(%)		
	I.H	C	I.H	C	I.H	C	
<i>C. albicans</i>	0(0,0)	1(2,5)	6(15,0)	13(32,5)	7(17,5)	13(32,5)	40(100,0)
<i>C. tropicalis</i>	1(4,0)	5(20,0)	4(16,0)	15(60,0)	0(0,0)	0(0,0)	25(100,0)
<i>C. parapsilosis</i>	0(0,0)	1(4,7)	7(33,3)	10(47,6)	1(4,7)	2(9,5)	21(100,0)
Outras	2(20,0)	8(80,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(20,0)	10(100,0)
<i>C. glabrata</i>	3(33,3)	6(66,7)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	9(100,0)
Total (%)	6(5,7)	21(20,0)	17(16,2)	38(36,1)	8(7,6)	15(14,2)	105(100,0)

I.H. ⇒ Infecção hospitalar

C ⇒ Colonização

Índice 1 – Ausência de atividade enzimática

Índice 2 – Atividade enzimática positiva

Índice 3 – Atividade enzimática fortemente positiva

Pz ⇒ Valores da atividade enzimática, segundo Price et al. (1982)

Para a distribuição enzimática para fosfolipase, em relação a infecção hospitalar (I.H.) e colonização (C), 12,38% das espécies em situação de infecção hospitalar são positivas para fosfolipase e 29,52% das espécies em situação de colonização para fosfolipase como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Atividade fosfolipásica apresentada por amostras de leveduras isoladas em situação de infecção hospitalar e colonização.

Espécies de leveduras	Índice de atividade de fosfolipase						Total
	Pz=1 n(%)		Pz=2 n(%)		Pz=3 n(%)		
	I.H	C	I.H	C	I.H	C	
<i>C. albicans</i>	0(0,0)	0(0,0)	3(7,5)	8(20,0)	10(25,0)	19(47,5)	40(100,0)
<i>C. tropicalis</i>	5(20,0)	19(76,0)	0(0,0)	1(4,0)	0(0,0)	0(0,0)	25(100,0)
<i>C. parapsilosis</i>	8(33,1)	13(61,9)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	21(100,0)
Outras	2(20,0)	5(50,0)	0(0,0)	1(10,0)	0(0,0)	2(20,0)	10(100,0)
<i>C. glabrata</i>	3(33,3)	6(66,7)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	9(100,0)
Total (%)	18(17,1)	43(40,9)	3(2,8)	10(9,5)	10(9,5)	21(20,0)	105(100,0)

I.H. ⇒ Infecção hospitalar

C ⇒ Colonização

Índice 1 – Ausência de atividade enzimática

Índice 2 – Atividade enzimática positiva

Índice 3 – Atividade enzimática fortemente positiva

Pz ⇒ Valores da atividade enzimática, segundo Price et al. (1982)

Discussão

Os fatores de virulência de *Candida* spp têm atraído interesse como possível meio para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas contra candidíase (GHANNOUM, 2000).

Um dos fatores de virulência do gênero *Candida* mais estudado, é a produção de enzimas extracelulares como proteinases ácidas e fosfolipases, uma vez que exercem importante papel na patogênese de candidíase (HUBE, 1996, 1998; IBRAHIM et al., 1995; RÜCHEL, 1999).

Segundo Rüchel et al. (1983) verificaram uma correspondência por ordem de virulência das espécies mais envolvidas em quadros patológicos para o homem, conforme a quantificação da proteinase, sendo as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* as mais importantes depois de *C. albicans*. No presente trabalho, *C. albicans* foi a espécie que mais apresentou atividade fortemente positiva para proteinase (50%). Para esta mesma atividade, *C. parapsilosis* apresentou 14,29%.

Samaranayake et al. (1984) avaliaram a capacidade de diferentes espécies de *Candida* spp, em produzir fosfolipase e seus resultados mostraram que de 41 isolados de *Candida*, 79% das cepas de *C. albicans* estudadas produziram fosfolipases enquanto que, nenhuma cepa de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* produziram esta enzima. No presente trabalho, 100% das espécies de *C. albicans* produziram fosfolipase e 4% de *C. tropicalis*. Entretanto, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não produziram atividade fosfolipásica, concordando assim, com o referido autor.

Vários investigadores têm demonstrado a presença de fosfolipase *in vitro*, em isolados clínicos de *C. albicans*. Entretanto, na presente pesquisa, foi também observada a produção de fosfolipase em *C. tropicalis* (4%), porém em menor proporção do que em *C. albicans* (100%).

Leveduras isoladas de casos colonização, tiveram maior produção de fosfolipase e proteinase em relação aos casos de infecção hospitalar, sendo importante salientar que, isolados de colonização com potencial de virulência são de grande risco para o desenvolvimento de doenças invasivas (TRAORÉ; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2002; BONASSOLI; BERTOLI; SVIDZINSKI, 2005).

Conclusão

Quanto à produção de exoenzimas, das 105 amostras, 21,90% apresentaram atividade fortemente positiva (índice 3) para proteinase e

29,52% das amostras apresentaram atividade fortemente positiva para fosfolipase.

Através da produção de enzimas extracelulares, podemos concluir que, *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior porcentagem de produção tanto de fosfolipase quanto de proteinase, sendo esta considerada, dentre as espécies estudadas, a mais patogênica. Entretanto, é importante observar outros fatores relacionados à virulência, tais como: adesão, formação de tubo germinativo, toxinas do microrganismo, como também os fatores relacionados ao hospedeiro.

Referências

- BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **J. Hosp. Infect.**, v.59, n.6, p.159-162, 2005.
- GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol., Rev.**, 13(1): 122-143, 2000.
- HATTORI et al. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.22, 1981.
- HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.7, p.55-69, 1996.
- HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.15, p.65-68, 1998.
- IBRAHIM, A.S. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.63, p.1993-1998, 1995.
- KAMINISHI et al. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infectious Immunology**, v.53, 1986.
- LACAZ, C.S. et al. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.
- MENEZES, E.A. et al. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.40, n.5, 2004.
- PENHA, S.S. et al. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.14, n.2, 2000.
- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, n.7, 1982.
- RÜCHEL, R. et al. *Candida* acid proteinases. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.30 (suppl 1), 1992.
- RÜCHEL, R. Proteinases of pathogenic fungi. **Mycoses**, v.42 (suppl.1), p.48-52, 1999.
- RÜCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abst. Orig.** 255: 237-248, 1983.
- SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MACFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia**. 22: 201-207, 1984.
- TRAORÉ, O.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. **J. Appl. Microbiol.**, v.92, n.3, p.549-555, 2002.
- ZAITZ, C. et al. Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1998.