

INDUÇÃO DO PLEOMORFISMO DE *Candida albicans* POR SORO FETAL BOVINO

Adolfo José da Mota¹, Francisco G. da Nóbrega²

1, 2 - 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: adolfo.mota@directnet.com.br; fgdnobre@univap.br

Resumo – Nas últimas duas décadas vários estudos vêm sendo realizados com *Candida spp*, sendo *Candida albicans* a espécie mais estudada; tais estudos foram motivados por dois fatores: crescimento das infecções hospitalares em vários sítios anatômicos e o sequenciamento completo do genoma desse fungo. Neste estudo investigamos o efeito da inativação do gene HEX1 e estabelecemos a condição de cultivo mais adequada na indução do pleomorfismo. Concluímos que a ausência do produto ativo deste gene não afeta a conversão morfológica para pseudo-hifas o que sugere que os mutantes mantém a virulência típica da linhagem selvagem e que a melhor condição de cultivo é a incubação em FBS puro.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Pleomorfismo, Ácido Hialurônico, Soro Fetal Bovino, Pseudo-hifas
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A *Candida albicans* é um fungo diplóide, heterotrófico, pertencente à classe Deuteromycetes do filo ASCOMYCOTA [1, 2, 3]. Os deuteromicetos são ditos fungos imperfeitos porque perderam a capacidade de reprodução sexuada [1]; reproduzem-se por conídios [3].

Os fungos em geral apresentam duas formas vegetativas que são unicelular ou leveduriforme e filamentosa. Contudo, além desses dois grupos, leveduriforme e filamentoso, existe um terceiro grupo denominado dimórfico. Como o próprio nome sugere, o grupo dimórfico apresenta-se tanto na forma filamentosa quanto leveduriforme e quem determina essa metamorfose é a temperatura a que o fungo é exposto. Em geral, os fungos desse grupo são encontrados na natureza à temperatura ambiente (25° a 28° C) na forma filamentosa, conhecida como micélio e quando expostos a um estresse térmico, com temperaturas entre 37° e 39° C, mudam de filamentosos para leveduriforme [4]. Normalmente, *Candida albicans*, é encontrada no meio ambiente na forma unicelular, podendo produzir pseudo-hifas que na maioria das vezes são formadas durante o brotamento simples [4]. Porém, quando os ciclos biológicos de nutrição e reprodução estão em plena atividade, esta pode apresentar forma filamentosa verdadeira; esse fenômeno é conhecido como pleomorfismo que difere do dimorfismo porque independe da temperatura a que o fungo é exposto [4]. Alguns autores associam tal fenômeno, bem como a produção de pseudo-hifas, com a virulência e patogenicidade típicas dessa espécie.

Nas últimas duas décadas os fungos do gênero *Candida spp*. vêm recebendo notório destaque na literatura médica. Colombo (2003) faz referência ao aumento de infecções hospitalares causadas por *Candida spp*. Segundo ele, no início da

década de 80, *Candida spp* era apenas o sétimo patógeno relacionado com infecções de hospitais terciários dos Estados Unidos da América. No final da década de 80 já era o quinto e hoje, segundo o autor, *Candida spp*, responde por 8% dos casos de infecção hospitalar, sendo o quarto patógeno a ser isolado nos testes diagnósticos [5]. No Brasil há poucos dados, apenas um estudo epidemiológico na cidade de São Paulo durante 12 meses, entre 2002 e 2003, onde *Candida spp* respondeu por 4.3% das infecções hospitalares [5]. Dentre os fungos do gênero *Candida*, a *Candida albicans* é a espécie mais freqüentemente isolada em processos infecciosos humanos [5, 6]. Infecções por *Candida albicans* são tidas como de caráter oportunista porque acometem pacientes imunocomprometidos, onde há uma quebra no equilíbrio entre hospedeiro-parasita, como é o caso de pacientes com AIDS [2, 7]. Os principais fatores de virulência e patogenicidade conhecidos até o momento são a grande capacidade de aderência aos diversos tipos de tecidos, conferida pelas adesinas [8]; produção de hifas e pseudo-hifas que auxiliam na invasão do tecido, produção de toxinas e enzimas [5].

Dessa forma, determinar quais substratos induzem a formação de pseudo-hifas e hifas verdadeiras nesse patógeno é de fundamental importância para compreender o processo infeccioso e assim, ofertar subsídios para o desenvolvimento de possíveis profilaxias e tratamentos para as infecções causadas pela *Candida albicans*. Utilizamos como modelo nesta análise linhagens com o gene HEX1 intacto ou inativado, e examinamos a capacidade dessas cepas formarem as pseudo-hifas características.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas duas linhagens de *Candida albicans* (cortesia do Professor Richard D Cannon, PhD da Universidade de Otago, Nova Zelândia), uma selvagem, MMY 56 (HHU) e uma mutante para o gene HEX1, MMY 879 (H-U3) que tem o gene HEX1 completamente deletado.

Estas linhagem foram cultivadas em meio mínimo (WO – with out) e meio rico (YPD - Yeast Pepton Dextrose), líquidos, puros, ou complementados com ácido hialurônico (HA) e soro fetal bovino (FBS), totalizando sete condições diferentes de crescimento para o fungo.

Meio WO: 0,17% Yeast Nitrogen Base (YNB) sem sulfato de amônio e sem aminoácidos, 2% dextrose e 0,5% de sulfato de amônio. Meio YPD: Yeast Extract 1%, peptona 2% e dextrose 2%.

Os meios foram esterilizados por autoclavagem.

Preparo da solução de ácido hialurônico – HA (SIGMA). Foi diluído 10 mg de HA em 1 ml de AD. Feita esterilização por filtração (membrana Millipore – 0,45 µm).

Preparo dos meios para o cultivo das duas linhagens de *Cândida albicans*.

Meio 1

WO 5,00 ml

Meio 2

WO 4,70 ml

Solução de HA 0,30 ml

Meio 3

WO 4,75 ml

Soro Fetal Bovino (FBS) 0,25 ml

Meio 4

YPD 5,00 ml

Meio 5

YPD 4,70 ml

Solução de HA 0,30 ml

Meio 6

YPD 4,75 ml

FBS 0,25 ml

Meio 7

FBS 5,00 ml

Inoculou-se uma pequena alçada de células, provenientes do repique do meio de manutenção para tubos eppendorfs contendo 0,5 ml de WO. Alíquotas de 0,02 ml desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 10 ml contendo 5 ml dos respectivos meios citados anteriormente, em um total de 14 frascos Erlenmeyer, 7 para MMY 56 (HHU) e 7 para MMY 879(H-U3).

Os frascos foram incubados a 37° C em agitador rotatório (Incubadora Shaker MA420 da Marconi) a 110 rpm por 72 horas até 7 dias.

A morfologia das duas linhagens nos diferentes meios foi examinada por microscopia (microscópio Leica DMLB equipado com sistema de fotografia MPS 60) após 24 horas. A amostra

para análise foi examinada entre lâmina-lamínula. (com 5 µl da cultura e 10 µl de AD).

Resultados

Os resultados obtidos estão nas Figuras de 1 a 7.



Figura 1 – MMY 56 em WO 72h

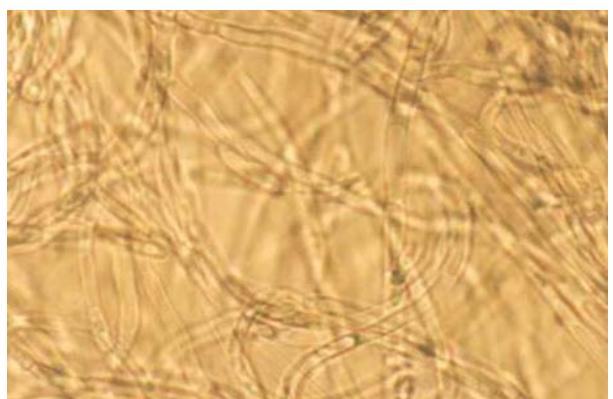


Figura 2 – MMY 56 em WO e SFB 72h



Figura 3- MMY 56 em WO e SFB 120h

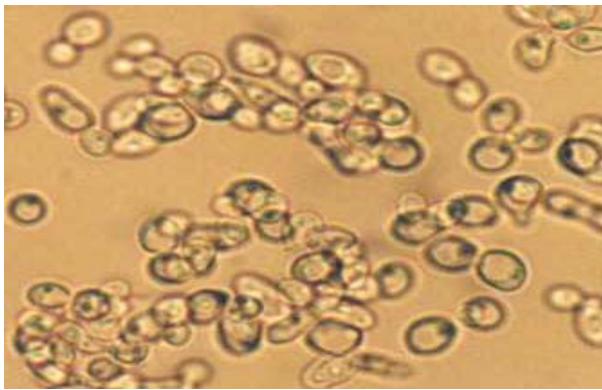


Figura 4- MMY 56 em YPD 72h

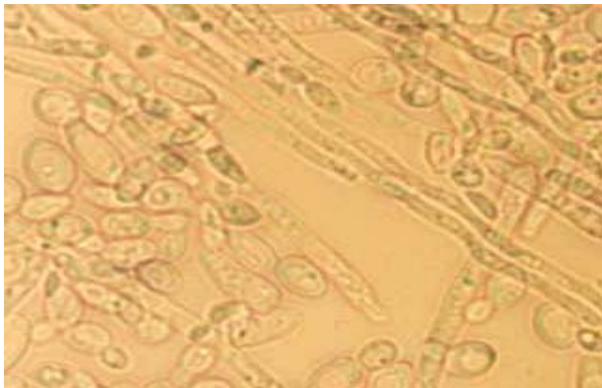


Figura 5- MMY 56 em YPD e SFB 72h

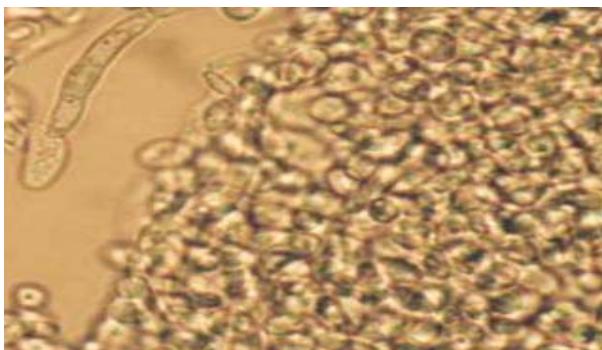


Figura 6- MMY 56 em YPD e SFB 120h



Figura 7- MMY 56 em SFB 72h

Discussão

Não foram observadas diferenças morfológicas entre a linhagem selvagem, MMY 56 e a mutante, MMY 879. O gene HEX1 que codifica a enzima beta-N-Acetylglucosaminidase [7] possivelmente não está relacionado com a morfologia do fungo. Este gene seria um dos candidatos a codificar uma suposta hialuronidase descrita em 1988 por SHIMIZU, que é secretada por certos isolados de *Cândida spp.*

Entre os meios testados, os resultados para os meios acrescidos apenas com ácido hialurônico foram semelhantes aos respectivos meios puros, (Fig. 1 e Fig. 4). Já os meios contendo soro fetal bovino e ácido hialurônico apresentaram o mesmo resultado dos meios acrescidos apenas com soro fetal bovino (Fig. 2 e Fig. 5). Nesses testes pode ser observado que o ácido hialurônico não interferiu nas mudanças morfológicas apresentadas pelo fungo.

O pleomorfismo total [4] ocorreu apenas em soro fetal bovino puro incubado à 37° C (Fig. 7). Nesta condição não houve a ocorrência leveduriforme e sim uma alta semelhança com a forma micelial.

Em todas as outras condições contendo soro fetal bovino foram observadas tanto a forma filamentosa como a leveduriforme. Para o meio WO acrescido de FBS 5%, até 72h de crescimento o predomínio foi da forma filamentosa (Fig. 2), sendo que para as observações de 96h e 120h a forma leveduriforme passou a predominar.

Em YPD acrescido de FBS 5% predominou sempre a forma leveduriforme porém, houve uma redução na quantidade da forma filamentosa verdadeira a partir de 72h de crescimento (Fig. 5), tornando-se raras em 120h de crescimento (Fig. 6). O aumento na concentração de FBS nos meios WO e YPD não interfere na observação qualitativa, apenas na relação quantitativa entre as formas filamentosa e leveduriforme.

Conclusão

A melhor condição testada para indução do pleomorfismo da *C. albicans* foi o inóculo de uma pequena quantidade do fungo em FBS puro com incubação a 37° em agitador rotatório. Resultando em conversão completa.

A ausência do produto ativo do gene HEX1 não interferiu na conversão para pseudo-hifas sugerindo um papel secundário desse gene na virulência e patogenicidade do fungo.

Agradecimentos

Agradecemos à Doutora Cláudia Campos pela colaboração no planejamento dos controles e preparação das imagens.

Referências

- [1] A. WALTHER, J. WENDLAND. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet* (2003) 42: 339-343
- [2] BRIAN ENLOE, AVIVA DIAMOND and AARON P. MITCHELL. A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, oct. 2002, p. 5730-5736.
- [3] GUERRERO, Rosa Trinidad; SILVEIRA, Rosa Mara Borges da. Glossário ilustrado de fungos, termos e conceitos aplicados à Micologia, 2.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2003.
- [4] SIDRIM, José Júlio Costa; MOREIRA, José Luciano Bezerra. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999. 287P ISBN 8527704951
- [5] COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thais. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36 n.5 Uberaba set./out. 2003.
- [6] ALONSO-MONGE R., NAVARRO-GARCIA F., ROMÁN E., EISMAN B., NOMBELA C., PLA J.. Strategies for the identification of virulence determinants in human pathogenic fungi. *Curr Genet* (2003) 425: 301-312
- [7] RICHARD D. Cannon, KYOKO Niimi, HOWARD F. Jenkinson, and MAXWELL G. Shepherd. Molecular cloning and Expression of *Candida albicans* beta-N-Acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *Journal of Bacteriology*, may 1994, p. 2640-2647.
- [8] PANIZO, M. M. y REVIÁKINA, V. Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. *Ver. Soc. Venz. Microbiol*; 21 (1): 5-11, ene, - jun. 2001. Ilus, tab.