
**PREVALÊNCIA E PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS
POR ESPÉCIES DE *Candida*
PROVENIENTES DA MUCOSA BUCAL
DE PACIENTES COM AIDS E INDIVÍDUOS HÍGIDOS**

Patrícia Valéria Gomes Castelo Branco,¹ Dália Cristine Vaz dos Anjos,² Fabiana Beserra do Nascimento,² Iven Neylla Farias Vale,¹ Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo,³ Silvio Gomes Monteiro,¹ Patrícia de Maria Silva Figueiredo¹ e Cristina de Andrade Monteiro¹

RESUMO

Infecções por leveduras do gênero *Candida* têm gerado elevados índices de morbidade e mortalidade, longo período de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo de tratamento. Indivíduos imunodeprimidos como os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) apresentam grande suscetibilidade a desenvolver essas infecções em razão do baixo número de linfócitos T-CD4, menor que 200 cel/mm³. *Candida albicans* é a espécie mais estudada e está relacionada com os processos de colonização e patogenicidade na boca do homem. Essa característica é decorrente, entre outros fatores, da produção de exoenzimas facilitadoras da interação do fungo com as células do hospedeiro. Este estudo verificou a produção das exoenzimas proteinase, fosfolipase, gelatinase e hemolisina de amostras bucais de *Candida* isoladas de 49 pacientes com AIDS (grupo teste) e de 26 indivíduos hígidos (grupo controle). *C. albicans* foi a espécie mais prevalente no grupo teste (59,2%) e *Candida parapsilosis* (53,8%) no grupo controle. *C. albicans* apresentou resultados significativos para a produção de proteinase (ambos os grupos) e fosfolipase no grupo teste. Já as espécies de *Candida* não *albicans* (CNA) apresentaram resultados altamente significativos para fosfolipase no grupo controle. Em relação às enzimas gelatinase e hemolisina, não foram encontradas diferenças significantes entre *C. albicans* e espécies CNA. Por fim, não foi encontrada diferença estatística na produção de exoenzimas quando foi comparado o grupo teste com o grupo controle.

DESCRITORES: *Candida*. Exoenzimas. Fatores de virulência. HIV/Aids.

-
- 1 Núcleo de Doenças Endêmicas e Parasitárias, Programa de Mestrado em Biologia Parasitária, Universidade do Ceuma.
 - 2 Alunas de Graduação – Núcleo de Doenças Endêmicas e Parasitárias, Universidade do Ceuma.
 - 3 Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social, Universidade Federal do Maranhão.

Endereço para correspondência: Patrícia Valéria Castelo Branco - Núcleo de Doenças Endêmicas e Parasitárias, Programa de Mestrado em Biologia Parasitária, Universidade do Ceuma, Rua Josué Montello, n. 01, Renascença II, CEP 65075-120 São Luís, MA, Brasil. E-mail: ifepv@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 22/8/2012. Revisto em: 14/10/2012. Aceito em: 30/10/2012.

ABSTRACT

Prevalence and exoenzyme production by *Candida* species from the oral mucosa of AIDS patients and healthy individuals

Infections by *Candida* species have generated high rates of morbidity, long hospital stay, high cost in treatment, and high mortality rates. Immunosuppressed individuals such as those with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) have greater susceptibility to developing these infections due to the low number of CD4 T-lymphocytes, less than 200 cells/mm³. *C. albicans* is the most studied species and is related to the processes of colonization and pathogenicity in man's mouth. This characteristic is due to, among other factors, production of exoenzymes which facilitate the interaction of the fungus with the host's cells. This study examined the production of exoenzymes protease, phospholipase, gelatinase and hemolysin samples of buccal *Candida* isolated from 49 AIDS patients (test group) and 26 healthy individuals (control group). *C. albicans* was the most prevalent species in the test group (59.2%) and *C. parapsilosis* (53.8%) in the control group. *C. albicans* showed significant results for the production of protease in both groups and phospholipase, in the test group. But the non-*Candida albicans Candida* (NCAC) species had highly significant results for phospholipase in the control group. For the enzymes gelatinase and hemolysin, there were not significant differences between *C. albicans* species and NCAC. Finally, there was no statistical difference in the production of exoenzymes when the test group was compared with the control group.

KEY WORDS: *Candida*. Exoenzymes. Virulence factors. HIV / AIDS.

INTRODUÇÃO

O aumento no número de infecções oportunistas causadas por fungos, principalmente em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), tem estimulado novas pesquisas para esclarecer os fatores de virulência e as circunstâncias da patogenicidade das várias espécies desses micro-organismos (46, 53).

O vírus HIV, além de destruir o principal linfócito, o T-CD4, produz uma série de outros distúrbios causados por micro-organismos tidos como comensais, como leveduras do gênero *Candida*, que causam muito comumente nos pacientes portadores desse vírus a chamada candidíase bucal (29). Na última década, vários estudos mostraram uma correlação positiva significante entre a ocorrência de candidíase e imunodepressão grave (14, 48, 51).

A candidíase bucal não é uma enfermidade mortal, mesmo que comprometa o paladar e a deglutição e, conseqüentemente, leve a uma diminuição do apetite, principalmente nos casos de pacientes HIV-positivos ou de pacientes hospitalizados e idosos. Entretanto, é a porta de entrada para complicações da candidíase do tipo orofaríngea, esofágica, laríngea e sistêmica (3).

A secreção de proteinases ocorre pelos genes denominados *Secreted aspartyl proteinases (Saps)*, muito importantes e bem conhecidos em *Candida albicans*. As proteinases facilitam a invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros pela ruptura das mucosas e degradam importantes proteínas de defesa imunológica

e estrutural (49), como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucina, lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas como as da classe IgA (13, 36). Já foram identificados dez genes *Saps* em *C. albicans* (37), quatro em *C. tropicalis* (40), três em *C. parapsilosis* (34) e nenhum em *C. glabrata* (49) e em outras espécies.

As enzimas categorizadas como fosfolipases (*PLs*, do inglês *phospholipases*) também são consideradas fatores de patogenicidade em *Candida*. *PLs* são enzimas que hidrolisam os fosfolipídios e os ácidos graxos e são classificadas de acordo com o seu modo de ação em *PLs* A, B, C e D (44). Vários estudos já mostraram que espécies de *Candida* não *albicans* (CNA) são capazes de produzir fosfolipases extracelulares (8, 16, 35).

Outra importante enzima é a gelatinase, também chamada de metaloendopeptidase extracelular, produzida por cepas de *Enterococcus faecalis*. Ela é codificada pelo gene *gelE* e hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos (52).

Há ainda a hemolisina, outro fator de virulência que contribui para a patogênese da candidíase, sendo classificada em dois tipos: α e β (19). As espécies de *Candida* usam esta enzima para degradar a hemoglobina ou hemina e extrair o ferro das células do hospedeiro, facilitando, assim, a invasão de hifas numa candidíase disseminada (49).

O estudo dessas enzimas é mais frequentemente descrito em *C. albicans*, onde se sabe que elas desempenham um papel central na patogenicidade da candidíase (45). Assim, pouco se sabe sobre a produção e secreção dessas exoenzimas por espécies CNA e seu subsequente papel na patogenicidade. Por esta razão, a proposta deste trabalho foi verificar a produção de exoenzimas por espécies de *C. albicans* e CNA, analisando a diferença na produção entre um grupo de pacientes imunodeprimidos e um grupo controle de indivíduos hígidos.

MATERIAL E MÉTODOS

População e amostra

Para o grupo teste foram usadas amostras de *Candida* provenientes da região retromolar da mucosa bucal de pacientes com AIDS, sob condições de terapia antiviral, antifúngica, internados no Hospital Presidente Vargas, na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. As leveduras foram coletadas com o auxílio de *swabs* estéreis e, posteriormente, crescidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

Estas amostras foram coletadas durante a realização da primeira parte da Tese de Doutorado da Msc. Analúcia Guerra Terças (Projeto Avaliação do Extrato da Folha da Goiabeira no Tratamento da Candidíase Oral em Ratos Imunossuprimidos; nº processo CEP 23115006540/2009-40 – Universidade Federal do Maranhão) e gentilmente cedidas pela pesquisadora à Coleção de Isolados Fúngicos do Laboratório de Micologia da Universidade do Ceuma.

Para o grupo controle, voluntários sem evidências clínicas de imunodepressão, negativos para o vírus HIV e outras patologias imunodepressoras participaram da busca de *Candida* spp de amostras bucais (nº processo CEP 226/2010 – Universidade do Ceuma). A coleta consistiu no uso de *swabs* estéreis para retirada de saliva da região retromolar do aparelho bucal e inoculação imediata em tubos de ensaio estéreis contendo caldo BHI.

As amostras de ambos os grupos foram incubadas a 37°C por 24 horas para crescimento e posterior isolamento em *Sabouraud Dextrose Agar* (DAS) acrescido de cloranfenicol. A identificação das espécies ocorreu presuntivamente pelo meio cromogênico CHROMagar *Candida*® (*BioMerieux*, França) e, posteriormente, pelo método automatizado VITEK YBC (*BioMerieux*, França). Foi incluída nos experimentos a linhagem padrão *C. albicans* ATCC 18804.

Produção de exoenzimas

A determinação da produção de proteinases foi realizada de acordo com a metodologia de Aoki et al. (1990) e a produção de fosfolipases pelo método em placa com gema de ovo descrito por Price et al. (1982).

Os testes foram feitos em triplicatas e o valor da zona de precipitação (Pz) foi dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia). A produção das duas enzimas foi classificada de acordo com Price et al. (1982), por meio do valor da Pz: muito forte ++++ (Pz ≤ 0,69), forte +++ (Pz entre 0,70-0,79), média ++ (Pz entre 0,80-0,89) ou fraca + (Pz entre 0,90-0,99).

Para os testes de produção de gelatinase, seguiu-se o protocolo de Kurtzman e Fell (1998), com algumas modificações. A atividade da gelatinase foi observada quando ocorreu a liquefação da gelatina.

Para a produção de hemolisinas, primeiro preparou-se as *Red Blood Cells* (RBC's) por meio da centrifugação de sangue de carneiro desfibrinado com *phosphate buffered saline* (PBS). Posteriormente, seguiu-se a metodologia de Manns et al. (1994), considerando algumas adaptações de Luo et al. (2001).

A hemólise foi classificada do tipo *beta* quando aparecia halo translúcido total ao redor do inóculo, atividade do tipo *alfa* quando formava halo preto esverdeado e atividade do tipo *gamma* quando não produzia hemólise (30). Já a intensidade da hemólise foi obtida pela razão: halo + colônia/colônia. Os experimentos foram feitos em triplicatas e o resultado consistiu em uma média dos valores obtidos. A classificação foi feita de acordo com o Índice Hemolítico (IH): positiva (1,00 < IH < 1,5); fortemente positiva (IH > 1,5).

Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa *BioEstat 5.0* (2007). Inicialmente, a relação dos resultados dos ensaios entre os grupos foi feita pelo teste

de Mann Whitney. A relação entre os grupos *C. albicans* e espécies de CNA foi feita pelo teste de qui-quadrado de independência (χ^2). O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Frequência e distribuição das amostras

Participaram da pesquisa 42 pacientes com Aids – 17 mulheres e 25 homens – com idades entre 22 e 61 anos. Em seis desses pacientes foram identificadas mais de uma espécie de *Candida*, o que resultou em 49 amostras para o grupo teste.

Para o grupo controle, 109 voluntários participaram da pesquisa. Destes, 67 eram mulheres e 42 homens, com idades entre 15 e 64 anos. Mostraram-se positivos para leveduras do gênero *Candida* 25 indivíduos – 14 mulheres e 11 homens –, número equivalente a 23% dos voluntários. Em um mesmo indivíduo foram identificadas duas espécies, totalizando, assim, 26 amostras de *Candida* spp para o grupo controle.

Foram identificadas nove espécies distintas de *Candida*: sete das quais no grupo teste e cinco no grupo controle, conforme distribuição na Figura 1. A espécie mais prevalente no grupo teste foi *C. albicans* e, no grupo controle, *C. parapsilosis*.

Atividade proteolítica

Para a produção de proteinase, 57/75 amostras (76,0%) foram positivas. Destas, 35/49 (71,4%) eram provenientes de pacientes com Aids e 22/26 (84,6%) de pacientes hígidos, diferença estatisticamente não relevante ($p = 0,1072$).

Do grupo teste, todas as amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram positivas, entretanto foram as únicas produtoras (Figura 3). Do grupo controle, mostraram-se positivas todas as amostras de *C. albicans* e *C. sake* e 12/14 amostras de *C. parapsilosis* (85,71%). As demais espécies não apresentaram a enzima proteinase (Tabela 1). Analisando estatisticamente, *C. albicans* demonstrou, sobremaneira, maior atividade proteolítica quando comparada às espécies de CNA em ambos os grupos ($p < 0,001$).

Quanto à classificação da atividade proteolítica, as amostras de *C. albicans* do grupo teste apresentaram produção de proteinase dos tipos média ++ (20,7%), forte +++ (48,3%) e muito forte ++++ (31,0%); com semelhante produção no grupo controle, média ++ (37,5%), forte +++ e (50%) muito forte ++++ (12,5%). Não houve amostra de *C. albicans*, em nenhum dos dois grupos, que apresentasse produção de proteinase do tipo fraca. Quanto à *C. tropicalis*, a maioria das amostras do grupo teste revelou produção de proteinase do tipo média ++ (50,0%); no grupo controle, a única cepa dessa espécie não produziu esta enzima. Quanto à

C. parapsilosis, a única amostra do grupo teste não foi produtora de proteinase; enquanto no grupo controle, 75% apresentaram proteinase do tipo forte (+++) e os 25% restantes, proteinase do tipo muito forte (++++) . As duas amostras de *C. sake* do grupo controle apresentaram proteinase forte +++ (Figura 2).

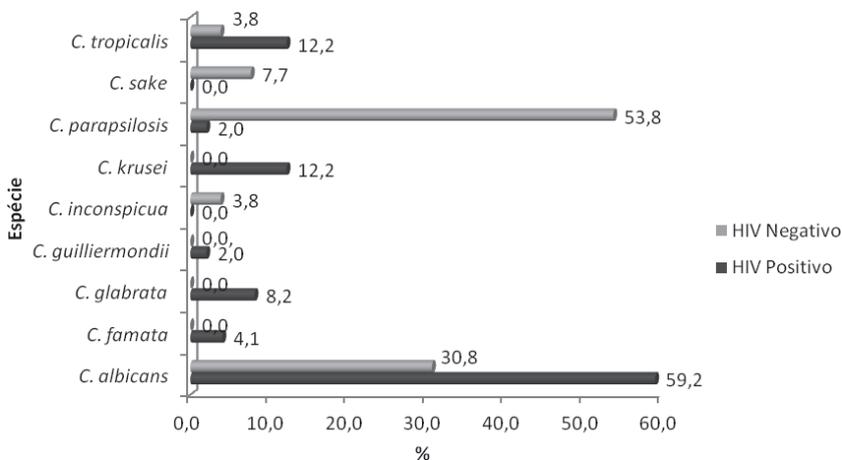


Figura 1. Frequência e distribuição das amostras de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com Aids (HIV positivo) e de indivíduos imunocompetentes (HIV negativo).

Tabela 1. Produção de exoenzimas por diferentes espécies de *Candida* de pacientes com Aids (Grupo teste) e indivíduos hígidos (Grupo controle)

ESPÉCIES	PROTEINASE		FOSFOLIPASE		GELATINASE		HEMOLISINA									
	Teste		Controle		Teste		Controle									
	+	-	+	-	+	-	+	-								
<i>C. albicans</i>	29	0	8	0	27	2	3	5	22	7	7	1	25	4	7	1
<i>C. tropicalis</i>	6	0	0	1	0	6	1	0	3	3	0	1	6	0	1	0
<i>C. krusei</i>	0	6	-	-	0	6	-	-	2	4	-	-	6	0	-	-
<i>C. glabrata</i>	0	4	-	-	0	4	-	-	4	0	-	-	3	1	-	-
<i>C. famata</i>	0	2	-	-	0	2	-	-	1	1	-	-	2	0	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	0	1	12	2	0	1	5	9	1	0	11	3	1	0	10	4
<i>C. guilliermondii</i>	0	1	-	-	0	1	-	-	0	1	-	-	1	0	-	-
<i>C. sake</i>	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	1	1	-	-	1	1
<i>C. incons/norveg</i>	-	-	0	1	-	-	1	0	-	-	0	1	-	-	1	0
TOTAL (%)	35 (71,4)	14 (28,6)	22 (84,6)	4 (15,4)	27 (55,1)	22 (44,9)	12 (46,2)	14 (53,8)	33 (67,3)	16 (32,7)	19 (73,1)	7 (26,9)	44 (89,8)	5 (10,2)	20 (76,9)	6 (23,1)

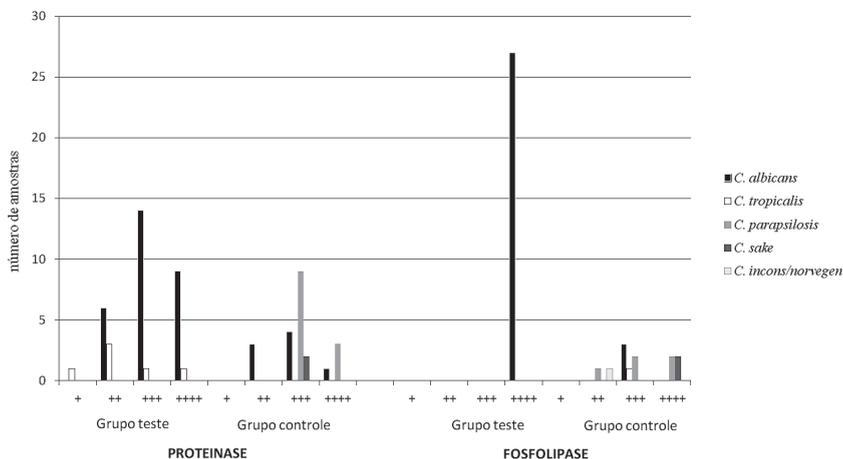


Figura 2. Atividade proteolítica e de fosfolipase de isolados de *Candida* obtidos dos grupos teste e controle.

Teste de fosfolipase

Em relação à produção de fosfolipase, 39/75 amostras (52,0%) foram positivas, sendo 27/49 (55,1%) provenientes de pacientes com Aids e 12/26 (46,2%) de pacientes imunocompetentes. Tal diferença não foi relevante estatisticamente ($p=0,257$).

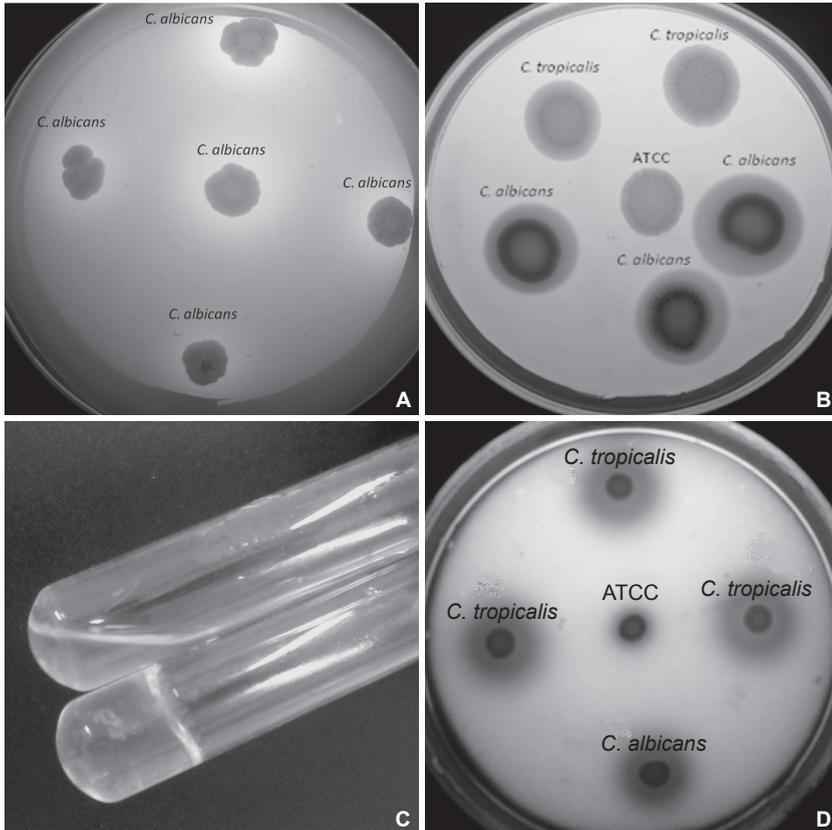
Do grupo teste, somente *C. albicans* (93,1%) apresentou esta enzima (Figura 3). Do grupo controle, todas as espécies foram produtoras: *C. albicans* com 37,5% e *C. parapsilosis* com 35,7%; *C. tropicalis*, *C. sake* e *C. inconspicua/norvegica*, com menor número de amostras, apresentaram 100% de positividade (Tabela 1). A maior atividade de fosfolipase no grupo teste por *C. albicans* e no grupo controle por espécies CNA foi altamente significativa ($p<0,001$).

Quanto à intensidade da atividade de fosfolipase, todas as amostras positivas de *C. albicans* do grupo teste foram consideradas de produção muito forte +++++. Já no grupo controle, todas as amostras de *C. albicans* positivas apresentaram intensidade do tipo forte +++, assim como *C. tropicalis* e algumas amostras de *C. parapsilosis*. Somente *C. parapsilosis* e *C. sake* mostraram atividade muito forte +++++ no grupo controle (Figura 2).

Testes de gelatinase

Nos testes de produção de gelatinase, 52/75 amostras (69,3%) foram positivas, sendo 33/49 (67,3%) provenientes de pacientes com Aids e 19/26 (73,1%) de pacientes hígidos. Tal diferença não foi relevante estatisticamente ($p=0,571$).

Com exceção de *C. guilliermondii* e *C. inconspicua*, com apenas uma amostra, todas as outras espécies de *Candida*, de ambos os grupos, mostraram ter capacidade de liquefazer a gelatina (Tabela 1, Figura 3). Comparando a produção de gelatinase entre as amostras de *C. albicans* e espécies CNA, não foi encontrada diferença estatística em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).



A – proteínase: formação de halo transparente por todas as amostras de *C. albicans*; B – fosfolipase: formação de halo opaco somente por *C. albicans*; C – gelatinase: a amostra do tubo superior liquefaz a gelatina, a do tubo inferior, não; D – hemolisinas: formação de halo de hemólise pelas amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Figura 3. Produção de exoenzimas por amostras de *Candida* isoladas da mucosa bucal de pacientes com Aids e de indivíduos imunocompetentes.

Atividade hemolítica em meio sólido

Todas as espécies deste estudo, em ambos os grupos, apresentaram atividade hemolítica em meio sólido: o grupo teste com 89,8% (44/49) e o grupo

controle com 76,9% (20/26). Pela análise estatística, essa diferença entre os grupos não foi significativa ($p=0,1190$).

Somente *C. albicans* e *C. glabrata*, do grupo teste, e *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. sake*, do grupo controle, tiveram linhagens que não apresentaram o fator hemolítico (Tabela 1).

Verificou-se somente hemólise dos tipos alfa (parcial) e gamma (ausência). A espécie que produziu os maiores índices hemolíticos foi *C. tropicalis* (Figura 3), com 67% e 100% das amostras fortemente positivas nos grupos teste e controle, respectivamente. Todas as outras espécies foram, em sua maioria, classificadas como positivas. O grupo teste foi o que mais teve cepas produtoras de hemolisinas fortemente positivas (40,9%), comparando-se aos 20% das amostras do grupo controle. Analisando os grupos *C. albicans* e espécies CNA, não foi encontrada diferença significativa em nenhum dos grupos para produção de hemolisinas ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

Espécies de *Candida* encontram-se presentes como comensais em superfícies de mucosas na pele do homem e de outros animais. Estima-se que 20% a 50% da população convivam com esta levedura na boca, sendo *C. albicans* prevalente entre 60% e 90% dos isolados, *C. tropicalis* em 7% e, em menor frequência, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. lusitanae* (4, 32).

A incidência de *C. albicans* na cavidade bucal é de 45% nos neonatos, 45% a 65% nas crianças saudáveis, 30% a 45% nos adultos saudáveis, 50% a 65% nas pessoas com dentaduras removíveis, 65% a 88% nas pessoas internadas por longo período, 90% nos pacientes com leucemia aguda submetidos a quimioterapia e 95% nos pacientes com Aids (2).

Vários estudos buscam esclarecer as espécies que prevalecem mais em determinados sítios do corpo e em determinados grupos de pessoas a fim de compreender as circunstâncias da patogenicidade. Por exemplo, em estudo sobre espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com lesões bucais características de candidíase e indivíduos com a boca clinicamente normal, Candido et al. (2000) encontraram maior prevalência de *C. albicans* em ambos os grupos. *C. albicans* também esteve em maior porcentagem neste estudo, entretanto somente no grupo teste. No grupo controle, a espécie que prevaleceu foi *C. parapsilosis*, diferindo de vários estudos nos quais *C. albicans* aparece em maiores proporções em grupos de indivíduos saudáveis (5, 22, 38).

Bonassoli et al. (2005) também encontraram maior prevalência de *C. parapsilosis* (51,0%) em indivíduos saudáveis numa pesquisa com amostras de *Candida* coletadas de mãos de profissionais que trabalham em hospital e de indivíduos da comunidade. A proporção de *C. parapsilosis* foi ainda maior quando foram considerados somente os indivíduos da comunidade (58,3%).

O aumento da frequência de espécies de CNA isoladas de diversos sítios do corpo e de dispositivos hospitalares é um fato que deve ser ressaltado, tendo em vista que muitos estudos tendem a centrar a preocupação exclusivamente em *C. albicans* e menos importância tem sido dada a outras espécies. Segundo El-Azizi et al. (2004), na candidíase bucal, por exemplo, é cada vez mais frequente o isolamento de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Para Pasqualotto (2004), *C. albicans* continua sendo o principal agente de candidemia no Brasil, mas crescem os casos por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Neste estudo, foram isoladas seis amostras de *C. tropicalis* no grupo teste (12,2%), contudo apenas uma única amostra dessa espécie foi isolada no grupo controle (3,9%). Para Barbedo e Sgarbi (2010), a detecção de *C. tropicalis* está normalmente associada à infecção, diferente de *C. albicans* que está associada à microbiota normal. Todavia, em diversos trabalhos (5, 10, 38), *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais isolada de pacientes saudáveis, perdendo somente para *C. albicans*. Resultado este observado apenas no grupo teste neste estudo.

C. glabrata não foi encontrada no grupo de indivíduos hígidos, corroborando os trabalhos de Basu et al. (2003) e Neto (2004). A literatura relata maior prevalência desta espécie em pacientes com complicações de transplante de medula óssea, pacientes com câncer e com o vírus HIV, além de pacientes idosos (11), grupos esses que não foram objeto deste estudo no grupo controle. Entretanto, para Kaur et al. (2005), *C. glabrata* é uma espécie comensal, podendo ser isolada em indivíduos saudáveis.

A produção de proteinase é considerada um importante fator de virulência porque aumenta a capacidade do micro-organismo colonizar e penetrar o tecido do hospedeiro, além de enganar o sistema imune, quebrando um número significativo de importantes proteínas da imunidade, como imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e citocinas (23). Assim, a virulência de espécies de *Candida* diminui quando inibidores de proteinase são usados no tratamento de candidíase, como já foi observado em *C. albicans*, sugerindo que o uso do inibidor pode atuar como fungicida ao diminuir a presença de candidíase bucal em pacientes com Aids (47).

Batista (2009) encontrou 91,0% de positividade para proteinase em amostras de *C. parapsilosis* provenientes de catéter e do sangue de neonatos, o que corrobora, em parte, os resultados encontrados neste trabalho, no qual se obteve 85,7% de positividade para esta espécie, porém nas amostras do grupo controle. Já Bonassoli et al. (2005) verificaram 100% de positividade para proteinase em amostras de *C. parapsilosis* de indivíduos saudáveis.

Matsumoto et al. (2002) verificaram que 96,4% das amostras de *C. parapsilosis* isoladas de sangue e catéter produziram proteinase fortemente positivas. Neste trabalho foi verificado que 75% (9/12) das amostras dessa espécie se apresentaram como forte e 25% (3/12) como muito forte. Esses dados referem-se ao grupo controle, uma vez que a única amostra dessa espécie do grupo teste foi negativa para esta enzima.

Em relação à *C. glabrata*, os resultados encontrados neste estudo concordam com alguns trabalhos já publicados, em que nenhuma amostra dessa espécie mostrou atividade proteolítica (10, 39). Esses resultados são corroborados ainda por Kaur et al. (2005) quando comparam a virulência de *C. albicans* com *C. glabrata* e afirmam que a diferença da primeira para a segunda, além da formação de hifas, é a produção de proteinases por *C. albicans*.

Rörig et al. (2009) encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, com 100% de positividade para proteinase pelos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras clínicas.

Costa (2009) também encontrou alta atividade proteolítica em seus isolados clínicos. As amostras de *C. albicans* foram maiores produtoras (88,1%) em comparação com as espécies CNA (69,8%), porém essa diferença não foi importante estatisticamente. Também foi observada no presente estudo maior atividade proteolítica em *C. albicans* comparando-se com as espécies CNA em ambos os grupos, resultados considerados altamente significantes ($p < 0,001$).

É interessante ressaltar que, apesar dos diversos estudos que tentam relacionar a atividade proteolítica com invasão e danos ao tecido do hospedeiro, Naglik et al. (2008) e Lerman & Morschhauser (2008) relataram, em seus trabalhos, que não foi encontrada relação entre a expressão do gene SAP e esses danos. Isso talvez explique o fato de linhagens de *Candida* de pacientes sem qualquer imunodepressão apresentarem atividade proteolítica na mesma proporção que cepas de pacientes com HIV/Aids, como foi mostrado neste estudo.

A fosfolipase está relacionada à maior capacidade de invadir o tecido. Algumas funções desta enzima durante a infecção têm sido postuladas, dentre elas destacam-se: penetração na célula do hospedeiro, adesão às células epiteliais e invasão do epitélio bucal humano (47).

No trabalho de Basu et al. (2003), 48,7% dos isolados de *C. albicans* de amostras clínicas de diversos sítios apresentaram atividade de fosfolipase, ao passo que se mostraram positivas somente 6,7% das amostras dessa espécie provenientes de indivíduos saudáveis. Esses resultados são corroborados pelo presente estudo, pois *C. albicans* produziu fosfolipase em 93,1% das amostras do grupo teste e somente em 37,5% do grupo controle.

Também semelhantemente ao observado neste estudo, Costa (2009) encontrou maior produção de fosfolipase em amostras de *C. albicans* (55,9%) comparando com as espécies CNA (37,7%) de amostras provenientes de pacientes com o vírus HIV, entretanto estatisticamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Já no presente estudo, essa diferença foi considerada altamente significativa ($p < 0,001$) para o grupo teste. No grupo controle, prevaleceu a produção de fosfolipase por espécies CNA, o que também foi considerado bastante significativo ($p < 0,001$).

Diversos estudos têm relatado a capacidade de espécies CNA produzirem fosfolipase extracelular (9, 20, 21). *C. tropicalis* é conhecida por ter reduzida

capacidade de produção desta enzima, embora vários autores relatem que a produção de fosfolipase extracelular é fortemente dependente da linhagem. Já sobre a produção de fosfolipase por *C. glabrata*, só foi encontrado na literatura o trabalho de D'êça Júnior et al. (2011), que verificaram 70,0% de positividade nas amostras clínicas.

Sobre a atividade da gelatinase em amostras de *Candida* não foram encontradas referências na literatura. Os poucos estudos sobre fungos são relativos a fungos filamentosos (18, 50). Assim, muito se tem a esclarecer sobre a produção desta enzima nessas leveduras. O que foi observado neste estudo é que, com exceção de duas espécies que só continham uma amostra cada, todas as outras espécies de *Candida* aqui estudadas foram capazes de liquefazer a gelatina. Um fato curioso foi que *C. glabrata*, considerada uma espécie que causa alta mortalidade em pacientes debilitados (11), foi 100% negativa para a produção de proteinase e fosfolipase, porém 100% positiva para a produção de gelatinase.

Quanto à hemolisina, sabe-se que ela facilita a invasão de hifas na mucosa do paciente numa candidíase disseminada e tem capacidade de lisar hemáceas em busca de ferro para favorecer seu crescimento e disseminação, podendo causar anemia e déficit de transporte de oxigênio nos pacientes. Assim, a produção desta enzima está relacionada à maior virulência das cepas (12, 24). Isso talvez justifique o fato de que, embora todas as amostras deste estudo, de ambos os grupos, tenham demonstrado capacidade hemolítica, as cepas do grupo teste foram significativamente mais hemolíticas ($p < 0,001$), tendo mais amostras classificadas como fortemente positivas (40,9%) em relação às cepas do grupo controle (20,0%).

Em um estudo realizado por França et al. (2010) com 28 amostras clínicas de *C. tropicalis*, 100% apresentaram atividade hemolítica, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. O mesmo resultado foi encontrado por D'êça Júnior (2010) em suas amostras clínicas de *C. tropicalis*, além de 100% de positividade também para *C. glabrata*, seguida de *C. albicans* (93,5%) e *C. parapsilosis* (28,6%).

CONCLUSÃO

C. albicans foi mais prevalente no grupo teste e *C. parapsilosis* no grupo controle.

Somente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram produtoras de proteinase.

Comparada às espécies CNA, *C. albicans* foi a maior produtora de proteinase em ambos os grupos; quanto à fosfolipase, *C. albicans* foi a maior produtora no grupo teste e as espécies CNA, no grupo controle.

Em relação às enzimas gelatinase e hemolisina, não foram encontradas diferenças entre *C. albicans* e espécies CNA.

Todas as espécies testadas têm capacidade hemolítica (tipo alfa), porém *C. tropicalis* destacou-se pelos maiores índices hemolíticos.

Não foram encontradas diferenças significativas na produção de exoenzimas quando comparados os grupos teste e controle, o que sugere que a maior prevalência da manifestação clínica de candidíase bucal em pacientes imunodeprimidos se deve mais à baixa imunidade do que, necessariamente, à maior virulência das *Candida* spp nesses pacientes.

As cepas provenientes de indivíduos hígidos podem ser as mesmas que venham a colonizar a mucosa bucal dessas pessoas quando numa situação de baixa imunidade, tornando-as susceptíveis às manifestações clínicas produzidas pelas exoenzimas dessas leveduras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriol* 273: 332-343, 1990.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 78: 455-459, 2002.
3. Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase: Revisão. *DST J Bras Doenças Sex Transm* 22: 22-38, 2010.
4. Barros LM. Ocorrência de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: Genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases. Piracicaba [Tese de Doutorado - UNICAMP/FOP] 2005.
5. Basu S, Gugnani HC, Joshi S, Gupta N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Rev Iberoam Micol* 20: 137-140, 2003.
6. Batista CMB. Perfil Fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de Hospital Terciário de São Paulo. São Paulo. [Tese de Doutorado em Ciências – ICB USP], 2009.
7. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 59: 159-162, 2005.
8. Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol* 52: 971-974, 2003.
9. Cafarchia C, Romito D, Coccioli C, Camarda A, Otranto D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Med Mycol* 46: 429-434, 2008.
10. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 437-442, 2000.
11. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 599-607, 2003.
12. Cookson AL, Bennett J, Thomson-Carter F, Attwood GT. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (ehxA) from shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 73: 6360-6369, 2007.
13. Costa CR. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos. Caracterização molecular de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol. Goiás [Tese de Doutorado em Medicina Tropical - UFG Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública], 2009.
14. de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicœur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 17: 729-759, 2004.

15. D'êça Júnior A. Atividade *in vitro* de fosfolipases, proteinases ácidas e hemolisinas de isolados clínicos de *Candida*. São Luís [Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária – Universidade Ceuma], 2010.
16. D'êça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Andrade-Monteiro C. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 334-338, 2011.
17. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol* 96: 1067-1073, 2004.
18. Fischer F, Cook NB. *Micologia: fundamentos e diagnóstico*. Revinter: Rio de Janeiro, 2001. p. 337.
19. França EJG, Favero D, Scremin H, Oliveira, MT, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 318-321, 2010.
20. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathol* 166: 209-217, 2008.
21. Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristán B, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol* 48: 207-210, 2010.
22. Gasparetto A, Negri MFN, Paula CR, Svidzinski TIE. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. *Acta Sci Health Sci* 27: 37-40, 2005.
23. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7: 55-69, 1996.
24. Hunt S, Moir AJ, Tzokov S, Bullough PA, Artymiuk PJ, Green J. The formation and structure of *Escherichia coli* K-12 haemolysin E pores. *Microbiology* 154: 633-642, 2008.
25. Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378-384, 2005.
26. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts - a taxonomic study*. Fourth revised and Enlarged edition. 1998.
27. Lerman U, Morschhauser J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* 154: 3281-3295, 2008.
28. Luo G, Samaranyake LP, Yau JYY. *Candida* Species Exhibit Differential *In Vitro* Hemolytic Activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971-2974, 2001.
29. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol* 79: 647-664, 2004.
30. Malcok HK, Aktas E, Ayıldız A, Yigit N, Yazgi H. Hemolytic Activities of the *Candida* Species in Liquid Medium. *EAJM* 41: 95-98, 2009.
31. Manns JA, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 62: 5154-5156, 1994.
32. Mardegan RC. Enzimação e genotipagem de isolados de *C. albicans* da cavidade oral de crianças cárie ativas e livres de cárie. Piracicaba [Dissertação de Mestrado – UNICAMP/FOP], 2003.
33. Matsumoto FE, Ruiz LS, Gandra RF, Auler ME, Marques SA, Costa Pires MF, Gambale W, Paula CR. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathol* 154: 63-69, 2002.
34. Merkerova M, Dostál J, Hradilek M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res* 6: 1018-1026, 2006.
35. Mohan V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 25: 208-210, 2008.
36. Naglik JR, Challacombe ST, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428, 2003.
37. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tschlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 154: 3266-3280, 2008.

38. Neto PV. Ação antifúngica de plantas medicinais e da própolis frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal, Ponta Grossa [Dissertação de Mestrado em Odontologia - UEPG Paraná], 2004.
39. Ozcan SZ, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Willke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS 114*: 139-145, 2006.
40. Para-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz 104*: 505-512, 2009.
41. Pasqualotto AC. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp na corrente sanguínea: coorte retrospectiva em hospital terciário brasileiro. Porto Alegre [Tese de Doutorado em Pneumologia – UFRGS Faculdade de Medicina], 2004.
42. Price MF, Wilkinson LD, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia 20*: 7-14, 1982.
43. Rörig KCO, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop 42*: 225-227, 2009.
44. Sahyun Hong, Eun-Min Cho, Seung-Eun Song, Chi-Yong Eom. Molecular Cloning of a Putative Gene Encoding Phospholipase B (plbA) from *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol Biotechnol 36*: 189-194, 2008.
45. Sandovsky-Losica H, Segal E. Infection of HEp-2 epithelial cells with *Candida albicans*: adherence and postadherence events. *FEMS Immunol Med Microbiol 46*: 470-475, 2006.
46. Santos ALS, Soares RMA. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. *FEMS Immunol Med Microbiol 43*: 13-20, 2005.
47. Schaller M, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol 34*: 169-180, 1999.
48. Soares LF, Portela MB, Souza IPR, Oliveira RHS. Candidíase bucal em crianças infectadas pelo HIV – acompanhamento de quatro anos. *Rev bras Odontol 59*: 341-343, 2002.
49. Silva SCM. Virulence factors of non-*Candida albicans* *Candida* species. [Dissertation for PhD degree in Biomedical Engineering - Universidade do Minho]. Escola de Engenharia, 2010.
50. Souza TF, Scrofermeker ML, Costa JM, Carissimi M, Corbellini VA. Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 50*: 269-272, 2008.
51. Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol 40*: 341-350, 2002.
52. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Muder RR. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis 35*: 570-575, 2002.
53. Villaça JH, Machado AA. A AIDS e suas manifestações orais e periodontais: revisão de literatura. *Rev Assoc Paul Cir Dent 58*: 228-230, 2004.