

Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer

***Killer* toxin sensitivity and production of enzymes by *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with cancer**

Elida Elias de Oliveira, Soraya Cristina Silva, Ailton José Soares, Cecília Attux,
Brice Cruvinel e Maria do Rosário Rodrigues Silva

Resumo Infecções oportunistas da cavidade bucal são primariamente causadas por fungos do gênero *Candida* e freqüentemente ocorrem em pacientes com câncer que estão sobtratamento quimioterápico e antibacteriano. De 44 amostras coletadas da mucosa oral de pacientes com câncer, observou-se o isolamento de 25 leveduras do gênero *Candida* em cultivo realizado em ágar Sabouraud-dextrose. Foram identificados *Candida albicans* em 24 (96%) isolados e *C. krusei* em 1 (4%). As características fenotípicas das amostras de *Candida albicans* mostraram que todos os isolados foram fortemente proteolíticos, capazes de produzir fosfolipases e possuíam os biotipos caracterizados como 811(95,8%) e 511 (4,2%) em relação a susceptibilidade às toxinas *killer*.

Palavras-chaves: *C. albicans*. Câncer. Fosfolipase. Proteinase. Toxinas *killer*.

Abstract Opportunistic infections of the oral cavity are primarily caused by *Candida* and frequently occur in patients with cancer who are undergoing chemotherapy and antibiotic treatment. Of the specimens received from the oral mucosa of 44 patients with cancer, 25 (56.8%) yielded *Candida* on culture in Sabouraud agar. Twenty four of these isolates were identified as *C. albicans* (96%) and 1 as *C. krusei* (4%). The phenotypic characteristics of these isolates showed that all of them were strongly proteolytic, had a high ability to produce phospholipase, and presented the byotypes characterized as 811 (95.8%) and 511 (4.2%) in terms of susceptibility to *killer* toxins.

Key-words: *C. albicans*. Cancer. Phospholipase. Proteinase. *Killer* toxins.

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Profª Maria do Rosário Rodrigues Silva Disciplina de Micologia. R Delenda de Resende de Melo, s/nº. Setor Universitário 74605-050 Goiânia, GO.

Fax (062) 2023066.

Recebido para publicação em 18/12/97.

Candida albicans, levedura pertencente à biota normal humana, é freqüentemente encontrada como causadora de lesões em pacientes com câncer^{9 17}.

Terapia com corticóides ou antineoplásicos e o uso de dispositivos intravenosos contribuem para a ocorrência de candidíase. A aderência da levedura à superfície celular, a formação de tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa, a variabilidade fenotípica *switching*, a produção de toxinas e enzimas extracelulares constituem os fatores mais importantes para o desencadeamento de infecção por *C. albicans*^{4 5 13 14 18}. 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 epitelial²⁰. Segundo Samaranayake, 1984²⁴, entre as espécies de *Candida*, apenas *C. albicans* é capaz de produzir fosfolipase.

O efeito proteolítico de amostras de *C. albicans* foi demonstrado pela primeira vez por Staib et al, 1965²⁶. Esta enzima hidrolítica tem sido observada em sobrenadante de cultura e no citoplasma de blastoconídios de *C. albicans*. A proteinase extracelular produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular^{7 10 23}. Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas²².

Desde a década de 70, além do estudo de enzimas participantes do processo infeccioso, vários autores passaram a caracterizar as leveduras quanto ao fenômeno de produção de compostos proteicos denominados toxinas *killer*, observado em espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* e *Trichosporon*. O fenômeno *killer* é útil na diferenciação de leveduras dentro da própria espécie, podendo ser usado como marcador epidemiológico^{11 27}.

O presente estudo tem como objetivo verificar a produção de fosfolipase e proteinase por *Candida albicans* isoladas de lesões de mucosa bucal de pacientes com câncer e ainda caracterizar estas linhagens através do fenômeno *killer*.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e isolados. Foram estudados materiais provenientes da mucosa bucal de 44 pacientes com câncer internados nas enfermarias de Pediatria, Cabeça e Pescoço e Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, GO, durante o período de novembro de 1996 a junho de 1997. Os materiais foram colhidos de lesões pseudo-membranosas esbranquiçadas com quadro clínico semelhante ao de candidíase através de swab esterilizado. O material coletado foi colocado em solução fisiológica esterilizada (0,85%) e, posteriormente semeado em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol mantido à temperatura de 25°C e examinado diariamente por um período de 15 dias.

As leveduras isoladas foram identificadas através da formação de tubo germinativo, produção de clamidoconídios e provas de assimilação e fermentação de hidratos de carbono segundo Kreger-van Ryj, 1984¹².

Pesquisa de exoenzimas. Fosfolipase. A produção de fosfolipase foi verificada segundo Price et al, 1982²⁰. Colônias de *C. albicans* com crescimento de 48 horas em ágar Sabouraud dextrose foram inoculadas em pontos equidistantes nas placas de ágar fosfolipase com emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica. O ágar fosfolipase contém peptona-10g, glicose-30g, cloreto de sódio-57,3g, cloreto de cálcio-0,55g, ágar-20,0g e água destilada-1000ml. A leitura do teste foi realizada após 4 dias de incubação a 37°C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática, sendo os resultados apresentados em códigos: valor 1 quando Pz = 1,0 (ausência de atividade enzimática), valor 2 quando 0,64 < Pz < 1,0 (atividade enzimática positiva) e valor 3 quando Pz ≤ 0,63 (atividade enzimática fortemente positiva).

Proteinase. A produção de proteinase foi verificada segundo Ruchel et al, 1982²¹. O fenômeno foi observado a partir de amostras de *C. albicans* cultivadas por 24 horas em ágar Sabouraud dextrose a 25°C inoculadas em pontos equidistantes em placas de ágar proteinase (mistura de *yeast carbon base*-11,7g; albumina bovina fração V-2,0g; protovit-2,5ml e água destilada-100ml esterilizados em

filtros de Millipore de 0,22µm de diâmetro adicionada de ágar-15g e água destilada-900ml esterilizados por autoclave a 120°C durante 15 minutos).

As placas foram incubadas durante dois dias a 37°C e a leitura da atividade enzimática (Pz) foi realizada usando-se o mesmo esquema da atividade para fosfolipase.

Toxinas killer. O fenômeno foi verificado segundo Polonelli et al, 1983¹⁹. Os isolados em estudo foram cultivados por 24 horas em ágar Sabouraud modificado (peptona-10g, dextrose-20g, ácido cítrico-19,2g, fosfato de potássio bibásico-34,8g, ágar-20,0g e água destilada qsp para 1000ml ajustado a pH 4,5). Um (1) ml de suspensão de *C. albicans* correspondente a escala 3 de McFarland foi vertida em placas de Petri esterilizadas e, em seguida adicionadas de meio de ágar Sabouraud modificado acrescido de azul de metileno (30mg). Após a solidificação da suspensão e meio de cultura fez-se o inóculo na superfície do meio em pontos equidistantes das toxinas padrão K1 a K9, correspondendo respectivamente à *Hansenula sp* (Stumm-

1034), *Pichia sp* (Stumm-1035), *Hansenula anomala* (Um-Milano), *Hansenula anomala* (CBS-5759), *Hansenula anomala* (Ahearn-UN866), *Hansenula californica* (Ahearn-WC40), *Hansenula canadensis* (Ahearn-WC41), *Hansenula dimennae* (Ahearn-WC44), *Hansenula mrakii* (Ahearn-WC51). Estas nove cepas padrão procedentes da Universidade do Chile foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A leitura foi realizada 72 horas após incubação a 25°C e foram considerados insensíveis (+), os cultivos que apresentaram halo incolore e/ou zona de inibição com colônias azuis ao redor dos isolados "padrão", e como resistentes os cultivos que apresentaram crescimento ao redor das cepas "padrão".

Os resultados de sensibilidade às toxinas *killer* foram designados pelo esquema proposto por Polonelli et al, 1983¹⁹, composto por 3 dígitos, sendo que cada um representa a combinação dos resultados obtidos pelo conjunto de 3 cepas padrão como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Codificação do Sistema killer.

Atividade do 1º triplet				Atividade do 2º triplet				Atividade do 3º triplet			
K1	K2	K3	Código	K4	K5	K6	Código	K7	K8	K9	Código
+	+	+	1	+	+	+	1*	+	+	+	1*
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3*	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

* biotipo 311.

RESULTADOS

Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas em 25 (56,8%) dos 44 pacientes examinados. Os testes de identificação como produção de tubo geminativo, produção de clamidoconídios e provas de assimilação de hidratos de carbono, permitiram a identificação de 24 (96%) *C. albicans* e 1 (4%), *C. krusei*.

As 24 amostras de *C. albicans* estudadas apresentaram-se fortemente produtores de fosfolipase e de proteinase, sendo que a atividade enzimática de proteinase variou de 0,12 a 0,37, enquanto para fosfolipase houve uma maior variação, de 0,12 a 0,61. Os valores de proteinase e de fosfolipase encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de proteinase de fosfolipase de 24 isolados de *C. albicans* da mucosa bucal de pacientes com câncer .

	Proteinase	Fosfolipase
Varição de Pz*	0,12-0,37	0,12-0,61
Média de Pz*	0,21	0,34

*Pz = atividade enzimática.

Pela sensibilidade das amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer às 9 toxinas *killer*

podemos revelar dois biotipos: 811 e 511, que ocorreram em 95,8% e 4,2% dos isolados, respectivamente.

DISCUSSÃO

Infecções fúngicas nosocomiais são causas importantes de morbidade e ocasionalmente de mortalidade. Em 1995 Jarvis⁹, em um estudo epidemiológico realizado de 1980 a 1990, analisando 180 diferentes hospitais, verificou que 72,1% das infecções fúngicas eram devidas às espécies de *Candida*.

Em pacientes imunocomprometidos que apresentam granulocitopenia e em uso de quimioterapia antineoplásica, há um maior risco de infecções por *Candida*⁸. Lesões da mucosa bucal por espécies de *Candida* especialmente *C. albicans* são freqüentes nesses pacientes. Nas amostras coletadas da mucosa bucal dos 44 indivíduos com câncer do Hospital Araújo Jorge de Goiânia-GO, 25 (56,8%) possuíam lesões por *Candida*, sendo isoladas 24 (96%) *C. albicans* e 1 (4%) *C. krusei*.

Todas as amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer estudadas neste trabalho apresentaram-se com um alto nível de produção de proteinase e fosfolipase, exibindo valores semelhantes entre as várias linhagens. Vários investigadores têm demonstrado a presença da fosfolipase em isolados clínicos de *C. albicans*¹²³. Considerando-se que outras espécies de *Candida* apresentam estruturas semelhantes às de *C. albicans*, mas não são capazes de produção de fosfolipases, é plausível que estas enzimas provavelmente se relacionem com a patogenicidade do isolado²⁴.

A relação de virulência a proteinase foi demonstrada por Kwon-Chung et al, 1985¹³, que verificaram um maior período de sobrevivência entre camundongos injetados com mutantes de culturas de *C. albicans* com menor produção de proteinase do que das cepas mãe com grande produção desta enzima. Isolados que secretam proteinase possuem maior poder de invasão aos tecidos do hospedeiro, pois aderem-se com maior facilidade às células epiteliais^{6 18 25}. Os resultados obtidos no trabalho permitem postular que o grande número de lesões observados na mucosa bucal dos pacientes com câncer seja decorrente de fatores inerentes ao hospedeiro, como também das características exibidas pelos isolados.

O teste de sensibilidade às toxinas *killer* mostrou que isolados de mucosa bucal de pacientes com câncer são capazes de expressar na sua maioria apenas um biotipo. Entre os 24 isolados de *C. albicans* estudados, 23 (95,8%) mostraram-se com o biotipo 811, o que significa resistência às toxinas K1, K2 e K3. O sistema *killer* segundo Morace et al, 1984¹⁶ e Merz, 1990¹⁵ pode ser usado como marcador epidemiológico em casos de infecções nosocomiais causadas por leveduras patogênicas. Isolados de *C. albicans* podem sofrer alterações fenotípicas, por isto, para estudos epidemiológicos de infecções por *Candida*, obtidas de diferentes materiais clínicos, além das características fenotípicas, devem ser consideradas as características genotípicas expressas pelos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus *Candida albicans*: separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 23:47-54, 1985.
2. Barreto de Oliveira MT. Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias. Produção de exoenzimas e tipagem das amostras de *Candida albicans*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
3. Candido RC. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1991.
4. Chakrabarti A, Navak N, Talwar P. *In vitro* proteinases production by *Candida* species. *Mycopathologia* 114:163-168, 1991.
5. Delgado W, Aguirre J.M. Las micosis orales en la era del sida. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:14-22, 1997.
6. Ghannoum M, Abu-Elteen KH. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 24:407-413, 1986.
7. Hattori JE, Yoshiura K, Negi M, Ogawa H. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans* *Sabouraudia* 22:175-183, 1981.

8. Hoppe JE, Klingebiel T, Niethammer D. Orointestinal yeast colonization of pediatric bone marrow transplant recipients: surveillance by quantitative culture and serology. *Mycoses* 38:51-57, 1995.
9. Jarvis RW. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 20:1526-1530, 1995.
10. Kaminishi H, Hagihara Y, Hayashi S, Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infectious Immunology* 53:312-316, 1986.
11. Kandel JS, Stern TA. *Killer* phenomenon in pathogenic yeasts. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy* 15:568-571, 1979.
12. Kreger-van Rij NJW. The yeast: a taxonomic study. Editor Elsevier, Amsterdam, 1984.
13. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infectious Immunology* 49:571-575, 1985.
14. Mathews RC Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiology* 140:1505-1511, 1994
15. Merz WG. *Candida albicans* strain delineation. *Clinical Microbiology Reviews* 3:321-334, 1990.
16. Morace G, Archibucci C, Sestito M, Polonelli L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the *killer* system. *Mycopathologia* 84:81-85, 1984.
17. Muller J, Kappe R, Kubitzka D, Fesler R, Scheidecker J. The incidence of deep seated mycoses. *Mycoses* 31(suppl 1):9-28, 1987.
18. Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 26:277-283, 1988.
19. Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 17:774-780, 1983.
20. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7-14, 1982.
21. Ruchel J, Tegeler R, Trost MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:233-244, 1982.
22. Ruchel R, Uhlemann K, Böning B. Secretion of acid proteinase by different species of the genus *Candida*. *Zentralblatt Für Bakteriologie und Hygiene A*. 255:537-548, 1983.
23. Ruchel R, De Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Coleg GT. *Candida* acid proteinases. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 30 (suppl 1):123-132, 1992.
24. Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarland TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia* 22:201-207, 1984.
25. Shimizu K, Kondoh Y, Tanaka K. Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*: I. Invasion into choriallantoic membrane by *C. albicans* of different proteinase activity. *Microbiology Immunology* 31:1045-1060, 1987.
26. Staib F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* 4:187-193, 1965.
27. Woods DR, Bevan EA. Studies on the nature of the *killer* factors produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 51:115-126, 1968.