

***Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp**

Candida albicans isolated from buccal cavity of children with Down's syndrome: occurrence and growth inhibition by *Streptomyces* sp

José Daniel Gonçalves Vieira¹, Evandro Leão Ribeiro¹, Cerise de Castro Campos², Fabiana Cristina Pimenta¹, Orlando Ayrton de Toledo², Gustavo Morais Nagato³, Niwmar Alves de Souza³, Wesley Magno Ferreira⁴, Cléver Gomes Cardoso⁵, Sueli Meira da Silva Dias⁶, César Aparício de Araújo Júnior⁷, Daniel Teles Zatta⁷ e Juliana de Sousa dos Santos⁷

RESUMO

Comparação entre a presença de leveduras de Candida na cavidade bucal de crianças sem e com síndrome de Down mostrou-se estatisticamente significativa no caso de crianças afetadas por esta cromossomopatia, tornando-as mais predispostas à candidíase bucal, provavelmente favorecida pelas alterações anátomo-fisiológicas da boca em decorrência da trissomia do cromossomo 21. Recidivas constantes de candidíase bucal em crianças portadoras desta alteração cromossômica levou a busca de prováveis alternativas terapêuticas. Visando determinar a atividade antifúngica de Streptomyces sp isolados de diferentes solos brasileiros, 5 cepas foram testadas frente a Candida albicans, oriundas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down. Observou-se que os isolados apresentaram uma diversidade de tamanho dos halos (9-31mm de diâmetro) de inibição de crescimento das leveduras, sugerindo uma possível utilização em terapêutica antifúngica.

Palavras-chaves: Candida albicans. Síndrome de Down. Streptomyces sp.

ABSTRACT

Comparison of the presence of Candida yeasts in the buccal cavity of children without and with Down's syndrome showed a statistically significant difference in the case of children that were affected by this chromosomopathy, rendering them more predisposed to buccal candidiasis, probably due to anatomicophysiological alterations of the mouth resulting from trisomy of chromosome 21. Constant recurrence of buccal candidiasis in children with this chromosomal alteration lead to the search for a possible therapeutic alternative. Seeking to determine the antifungal activity of Streptomyces sp isolated from various Brazilian soils, 5 strains have been tested for Candida albicans isolated from the buccal cavity of children with Down's syndrome. It was observed that the isolate presented a diversity in the size of the halos (9-31mm in diameter) of growth inhibition of the yeasts, suggesting a possible use as a therapeutic antifungal.

Key-words: Candida albicans. Down's syndrome. Streptomyces sp.

1. Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2. Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, DF. 3. Cirurgiões-dentistas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 4. Especialista em Farmácia Hospitalar e Assistencial da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 5. Doutorando em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, Brasília, DF. 6. Mestranda em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 7. Farmacêuticos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Dr José Daniel G. Vieira. R. Delenda Resende de Melo s/n. Setor Universitário 74505-220 Goiânia, GO.

e-mail: jvieira@iptsp.ufg.br, evandro0@terra.com.br, wesleymf@terra.com.br, cardosocg@unb.br

Recebido para publicação em 23/3/2004

Aceito em 6/6/2005

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos integrantes da microbiota bucal do homem desde o nascimento². Esta condição microbiológica propicia comumente uma relação de equilíbrio entre parasita-hospedeiro, diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo leveduriforme, permanência equilibrada da capacidade de aderência e da produção de enzimas e toxinas. Alterações físicas, químicas, iatrogênicas e mecânicas, que se processem na cavidade bucal, como a mastigação, possam entre diversos fatores descritos favorecer a ruptura do equilíbrio estabelecido entre o fungo e o hospedeiro fazendo com que as infecções por *Candida* sejam de origem geralmente endógena^{2,3}.

Nas crianças com síndrome de Down, além das alterações anátomo-fisiológicas bucais, macroglossia, estagnação salivar decorrente de incompetência muscular da boca, dificuldade motora, constantes doenças respiratórias e comprometimento simultâneo da resposta imunológica inata e adquirida fazem com que estes fatores adicionais, as tornem mais suscetíveis a processos infecciosos, inclusive fúngicos, onde as espécies de *Candida* são os agentes etiológicos mais preponderantes^{4,7,17,18,20}. Este sítio bucal altamente povoado por cepas de *Candida* faz também com que as crianças detentoras desta alteração cromossômica possuam o *biofilme dentário* com uma interferência fúngica maior, fazendo com que haja uma ação direta ou coadjuvante na ocorrência da cárie dentária, gengivite e periodontite, quando os estreptococos do grupo *mutans* atuam como agentes principais^{3,12,15,19}. Candidíase pseudomembranosa é o quadro clínico fúngico mais detectável em crianças com esta cromossomopatia^{3,4,7,10}. Todavia, cerca de 20 a 55% da população assindrômica podem apresentar isolados de *Candida* como leveduras participantes da mucosa bucal do homem^{18,19,25}.

Drogas azólicas e antibióticos poliênicos constituem os recursos terapêuticos mais comumente empregados em candidíase bucal. Entretanto, constantes recidivas de manifestações de *Candida* na boca de crianças, inclusive nas portadoras de síndrome de Down, favorecem a busca de novas drogas¹¹.

Os antibióticos são exemplos de metabólitos secundários produzidos por certos microrganismos que possuem a capacidade de inibir o crescimento de seres microbiológicos, quando utilizados em baixas concentrações¹⁵. Do grande número de antibióticos conhecidos de origem microbiana, somente 123 são produzidos atualmente por fermentação. Além disto, mais de 50 antibióticos são produzidos como compostos semi-sintéticos e 3 antibióticos são sinteticamente produzidos^{6,21,22}. Entre as bactérias, a maior variedade em estruturas e número de antibióticos é encontrada nos actinomicetos, especialmente no gênero *Streptomyces*².

O isolamento de novos actinomicetos, principalmente *Streptomyces*, com atividade antifúngica tem sido apontado com grande entusiasmo no descobrimento de novos agentes antifúngicos com potencial de emprego terapêutico. Este isolamento está intimamente associado a técnicas clássicas para isolamento e seleção (técnica de diluição e inoculação em ágar com posterior utilização de fungos como alvos de seleção)¹³. Este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência e determinar a atividade antifúngica de *Streptomyces* sp, isolados dos solos

da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo (ES) e do Cerrado brasileiro frente às cepas de *Candida* oriundas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e identificação. Setenta amostras de secreção salivar foram coletadas com *swabs* esterilizados da mucosa jugal de crianças, sendo 35 amostras de crianças portadoras de síndrome de Down (grupo-teste) e as demais crianças desprovidas desta síndrome (grupo controle). Todas as crianças possuíam faixa etária de 0 a 10 anos, apresentavam mucosa bucal íntegra, não faziam uso de nenhuma medicação e foram atendidas na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) em Goiânia-GO, Brasil. Após a homogeneização, as amostras de saliva foram semeadas em duplicata em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e mantidas a temperatura ambiente por 15 dias no Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG). As colônias leveduriformes branco-amareladas desenvolvidas foram identificadas mediante pesquisa de tubo germinativo em soro fetal bovino, formação de clamidósporos em ágar corn-meal acrescido de tween 80 e realização de testes de assimilação e fermentação de carbono^{8,10}. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, e os pais e/ou responsáveis pelas crianças forneceram consentimento aos pesquisadores.

Estatística. Foi realizada aplicando o teste de χ^2 (Qui-quadrado) para correlacionar os índices de carreamento de leveduras de *Candida* entre as cavidades bucais de crianças com e sem síndrome de Down e os valores obtidos foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Cepas de *Candida* utilizadas na análise antifúngica. Foram escolhidas aleatoriamente 8 cepas de *Candida* isoladas e identificadas dentre as provenientes da mucosa bucal de crianças com síndrome de Down. Foi utilizado como referência a cepa de *C. albicans* CBS 562, previamente cedida pela micoteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) Brasil.

Isolados de *Streptomyces* sp utilizados. Foram utilizados 5 isolados de *Streptomyces* sp, provenientes dos solos da Mata Atlântica (ES) (TIJA 2, TIJA 12 e TILA 1) e do Cerrado brasileiro (ADU 1.3 e ADU 2.1). Estes isolados fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (IPTSP/UFG)²⁴.

Deteção de atividade antifúngica. Esporos dos *Streptomyces* sp foram cultivados em meio ágar ISP-2 (constituído de g/L: glucose 4; extrato de levedura 4; extrato de malte 10; ágar-ágar 20, pH 7,3) a 30°C por 15 dias até esporulação para a produção das possíveis substâncias antifúngicas. Após este tempo, *plugs* de 7mm de diâmetro foram cortados e inoculados em placas de Petri, contendo o meio de ágar Sabouraud dextrose, onde as cepas-teste de *C. albicans* e

também da cepa indicadora *C. albicans* CBS 562 foram previamente semeadas com auxílio de *swab*. Estas placas foram incubadas a 30°C por 2 dias até o desenvolvimento de halos de inibição de crescimento. Os diâmetros (mm) destes halos de inibição foram determinados segundo Vieira²⁴.

RESULTADOS

Das 70 amostras de secreção salivar coletadas das crianças detectou-se a ocorrência de *Candida* em 36 (51,4%) amostras, sendo todas pertencentes à espécie *albicans*. A diferença entre a detecção de leveduras de *Candida* carregadas entre as mucosas bucais de crianças com e sem síndrome de Down mostrou significância estatística ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de cepas de *Candida albicans* isoladas da mucosa jugal de crianças atendidas na Clínica de Odontopediatria da FO/UFG.

Cepas	Crianças com síndrome de Down		Crianças sem síndrome de Down*	
	nº	%	nº	%
<i>Candida albicans</i>	30	85,7	6	17,1
Total	35		35	

*Relação estatística entre os grupos CCSD e CSSD ($\chi^2 = 32,9$; $p < 0,05$)

Atividade antifúngica. Observou-se que todas as cepas de *Streptomyces* sp ensaiadas apresentaram atividade antifúngica frente às cepas de *C. albicans* testadas. O diâmetro do halo de inibição variou de 9 a 31mm dependendo da cepa de *Streptomyces* sp e da cepa de *C. albicans* indicadora (Tabela 2). A cepa de *Streptomyces* sp ADU 2.1 apresentou, em média, maior atividade frente às diferentes cepas de *C. albicans*.

Tabela 2 - Atividade antifúngica dos *Streptomyces* sp frente às cepas de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças com síndrome de Down*

Cepas de <i>Candida albicans</i>	Diâmetro dos halos de inibição (mm)				
	<i>Streptomyces</i> sp ADU 1.3	<i>Streptomyces</i> sp ADU 2.1	<i>Streptomyces</i> sp TIIA 2	<i>Streptomyces</i> sp TIIA 12	<i>Streptomyces</i> sp TIIA 1
1	25	30	23	14	23
2	25	20	25	17	25
5	28	30	28	19	26
13	25	30	23	11	22
22	25	20	21	9	20
36	25	30	23	15	20
41	26	31	25	12	22
47	23	27	28	20	24
CBS 562	26	30	22	13	23

* Parâmetros estatísticos de análise da tabela : média, análise de variância, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação: $\bar{x} = 22,87$; $S^2 = 28,47$; $s = 5,33$; $S_x = 0,84$ e $CV = 23,3\%$

DISCUSSÃO

Com base no censo populacional de 2000, a população infantil brasileira na faixa etária de 0 a 10 anos é aproximadamente de 36,3 milhões de crianças⁹. Sabendo que a frequência de crianças acometidas por síndrome de Down é estimada no Brasil em 1:600 nascimentos^{18 19 20}, teríamos, portanto 60,5 mil crianças portadoras desta síndrome, equivalendo aproximadamente a 0,2% da população infantil presente em nosso País. Esta realidade humana constitui sempre um desafio aos profissionais de saúde em busca de melhor condição de vida a estes futuros cidadãos brasileiros, inclusive no que diz respeito à saúde bucal e precisamente à bacteriologia e a micologia clínica.

A síndrome de Down é decorrente da trissomia do cromossomo 21 do cariótipo humano, a qual pode ser provocada por não-disjunção, translocação ou ainda mosaicismos²⁰. Esta cromossomopatia induz alterações bucais que afetam estruturas ósseas, como os dentes, língua gengiva e mucosa. Deste modo, a capacidade de colonização e/ou patogenicidade das cepas de *Candida* pode ser favorecida pela protusão da língua, respiração bucal, irritação da mucosa com fissuras linguais e nos cantos labiais, problemas respiratórios e higiene bucal deficiente^{17 18 19}.

Agrega-se ainda a esta situação, o comprometimento do sistema imunológico em relação as respostas celular e humoral. Linfócitos T e células *killer* possuem suas atividades funcionais afetadas. Níveis baixos de imunoglobulinas IgG₂ e IgG₄ favorecem infecções microbiológicas, além da irregularidade fisiológica da peróxido-desmutase comprometer a defesa orgânica contra microrganismos, levando cepas de *Candida* e *Staphylococcus* a serem agentes etiológicos predominantes nos processos infecciosos bucais¹⁹. O carregamento de leveduras de *Candida* na boca das crianças com síndrome de Down pode ser assim apontado como um provável fator indutor à candidíase bucal^{4 19}. Em nosso estudo, a elevada detecção de isolados de *C. albicans* presentes na mucosa bucal de crianças portadoras desta alteração cromossômica em relação ao grupo controle (crianças sem síndrome de Down) mostrou a predisposição significativa que estas crianças apresentam a esta patologia bucal induzida por este fungo leveduriforme. Carstedt e cols⁴ e Ribeiro e cols¹⁹ presenciaram esta mesma realidade trabalhando com prevalência de *Candida* na cavidade bucal de crianças e adolescentes com síndrome de Down suecos e brasileiros respectivamente. No entanto, o grupo controle (crianças sem síndrome de Down) apresentou uma ocorrência de leveduras de *C. albicans* presentes na boca um pouco abaixo da comumente detectada em crianças assindrômicas^{18 19 25}.

Apesar de todo arsenal antifúngico disposto no mercado, relatos de cepas de *Candida* resistentes a estes fármacos são cada vez mais comuns e as recidivas infecções bucais por estas leveduras em crianças com síndrome de Down estimulam a busca de potenciais alternativas terapêuticas que venham favorecer o surgimento de novos medicamentos^{16 23 25}.

Os actinomicetos, especialmente os *Streptomyces*, têm sido descritos como as maiores fontes de antibióticos desde que Waksman os introduziu num programa sistemático de seleção de novos antibióticos a partir de 1940¹⁴. A abordagem para a pesquisa e descobrimento de novos antibióticos é geralmente baseada na seleção de actinomicetos que ocorrem naturalmente¹². Erwealor & Njoku-Obi⁵ e Lee & Hwang¹¹ trabalhando com o isolamento e seleção de *Streptomyces* em solos africanos e coreanos, respectivamente, isolaram diversas espécies com atividade antifúngica, demonstrando que os ensaios *in vitro* para a seleção de compostos antifúngicos apresentaram grande sucesso.

Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo de trabalho sugerem um grande potencial na descoberta de novos produtos naturais biologicamente ativos de actinomicetos isolados de diferentes solos brasileiros¹²⁴. As substâncias bioativas produzidas por estes actinomicetos têm mostrado nos últimos anos uma das alternativas mais promissoras no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, antitumorais e enzimáticas^{16 11 23 24}. A inibição de cepas de *C. albicans*, procedentes da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down, pelos isolados de *Streptomyces* sp. testados, tem sugerido que novas condutas terapêuticas para o tratamento de candidíase bucal com recidivas frequentes apresente-se viável no futuro próximo⁶.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, RCLS, Pimenta, FC, Vieira, JDG. Determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de cerrado goiano e efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. *Revista de Patologia Tropical* 33: 217-226, 2004.
- Birman EG. Um breve retrospecto sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. *Revista Vida* 8: 56-59, 1998.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *C. albicans*. *Trends Microbiology* 9: 327-335, 2001.
- Carlstedt K, Krekmanova L, Dahllof G, Ericsson B, Braathen G, Modeer T. Oral carriage of *Candida* species children and adolescents with Down's syndrome. *International Journal Paediatric Dentistry* 6: 95-100, 1996.
- Erwealor IA, Njoku-Obi ANU. Antimicrobial activity of a *Streptomyces* species isolated from Nsukka soil. *World Journal Microbiology Biotechnology* 6: 337-339, 1990.
- Furlan RIA. Obtenção e estudo de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.
- Henning M, Perrone M. Prótesis odontológica en la ecología de *C. albicans* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana* 39: 78-84, 2002.
- Kreger-van RJ NJW: The yeast: a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo populacional, 2000. www.ibge.gov.br. Acesso em 28.02.2004.
- Lacaz CS, Porto E, Heins-Vacarrri EM, Melo NT. Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier, São Paulo, 1999.
- Lee JY, Hwang BK. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 407-417, 2002.
- Linossier A, Vargas A, Villegas R, Chimenos E. Quantitative relationship between salivary level of *S. mutans* and *C. albicans* in children with Down's syndrome. *Journal Medicine Oral* 7: 284-292, 2002.
- Maitan VR. Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 1998.
- Niroki N, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque – past and recent concerns. *Journal of Dentistry* 26: 299-304, 1998.
- Nolan RD, Cross T. Isolation and screening of Actinomycetes *In*: Cross T (ed) Actinomycetes in Biotechnology, Academic Press, London, p. 56-73, 1988.
- Okami Y, Hotta K. Search and discovery of new antibiotic *In*: Goodfellow ST, Williams MM (eds) Actinomycetes in Biotechnology, Academic Press, London, p. 37-67, 1988.
- Pardi G, Cardozo EI, Perrone M, Salazar E. Deteccion de espécies de *Candida* en pacientes con estomatitis sub-protésica. *Acta Odontológica Venezolana* 39: 62-69, 2002.
- Pires CC, Silva FA, Netto JV. Síndrome de Down – Implicações odontológicas e possibilidades terapêuticas. Anais do II Congresso Brasileiro e I Encontro Latino-Americano sobre síndrome de Down. Brasília p. 59-62, 1997.
- Ribeiro EL, Campos CCC, Crespo AMCC, Castro JS, Rocha FP, Alves M, Goulart MS, Cardoso C, Ferreira W, Naves PL, Soares AJ, Ribeiro SM, Pimenta FC. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. *Acta Médica Portuguesa* 3: 171-174, 2002.
- Roncario AM, Rodrigues AB, Elias MS. Síndrome de Down e Odontologia. *Investigação* 6: 70-74, 2002.
- Sant'Ana PJP, Assad AL. O Contexto brasileiro para a bioprospecção. *Biocologia: Ciência e Desenvolvimento* 29:32-37, 2002.
- Sato S. Produção de antibióticos. *In*: Lima UA, Aquarone E, Borzani, W, Schmidell W (eds) Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p.101-124, 2001.
- Semêdo LTAS. Atividade antimicrobiana e celulolítica de actinomicetos isolados de solos brasileiros. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1997.
- Vieira JDG. Purificação e caracterização de uma a-amilase de *Streptomyces* sp. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1999.
- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Australian Dentistry Journal* 43: 160-161, 1998.