

## **Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão**

## **Dimorphism, functional enzymes production and adhesins of *Candida albicans*: a mini review**

*Thais Herrero Geraldino*<sup>1</sup>, *Tânia Maris Pedrini Soares da Costa*<sup>1</sup>, *Cláudia Roberta Brunnuell*<sup>1</sup>, *Natália Veronez da Cunha*<sup>1</sup>, *Pamela Micheletti*<sup>1</sup>, *Ivete Conchon Costa*<sup>2</sup>, *Ionice Felipe*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, UEL

<sup>2</sup> Docente do Depto de Ciências Patológicas, CCB/Uel

### **Endereço para correspondência:**

Ionice Felipe

Depto. de Ciências Patológicas

Rodovia Celso Garcia Cid PR445 Km 380 Campus Universitário

CEP: 86.057-970 Londrina-Pr

ionice@uel.br

### **Resumo**

*Candida albicans* pode causar infecções de risco em pacientes imunocomprometidos. Vários fatores de virulência contribuem para a patogenicidade de *C. albicans*, incluindo a capacidade de aderir às células epiteliais e endoteliais por expressão de adesinas. O patógeno secreta enzimas que são adicionais a sua patogenicidade; proteinases que hidrolizam ligações peptídicas e fosfolipases que hidrolizam fosfolipídeos. As proteinases tem papel auxiliar em favorecer a adesão, causando estrago ao tecido e participando do processo de disseminação por infecção intravenosa. A capacidade para alternar seu crescimento entre formas de levedura e hifa está frequentemente relacionado com patogenicidade. *C. albicans* filamentosa não expõe  $\beta$ -glucana na cicatriz do brotamento desde que a separação entre mãe e filha não ocorre, e assim a forma filamentosa falha para ativar defesa mediada por receptor dectina-1, incluindo a fagocitose, ativação de produção de reativos de oxigênio, e secreção de IL-12. O objetivo principal deste trabalho foi rever os artigos relacionados com fatores de virulência de *C. albicans* para aumentar nossa compreensão da patogênese de *C. albicans*.

**Palavras chaves:** Dimorfismo, proteinases, fosfolipases, adesinas e *Candida albicans*

### **Abstract**

*Candida albicans* is capable of causing life-threatening infection in immunocompromised patients. Several known virulence factors contribute to the pathogenicity of *C. albicans*, including the ability to adhere to epithelial and endothelial cells by expression of adhesins. In addition, the pathogen secretes enzymes that are considered integral to its pathogenesis; proteinases which hydrolyze peptide bonds, and phospholipases which hydrolyze phospholipides. The proteinases have auxiliary roles in promoting adhesion, causing damage to tissue and participating of process of dissemination

by intravenous infection. The ability to switch its growth form between two morphogenetic transitions, the yeast and hyphae forms is often correlated with pathogenicity. *C. albicans* filaments do not expose  $\beta$ -glucan in bud scars since mother-daughter cell separation does not occur, and thus filamentous *Candida* fails to activate dectin-1 mediated defenses, including phagocytosis and activation of reactive oxygen production, and IL-12 secretion. The main objective of this work was to analyse the articles related with virulence factors of *C. albicans* to increase our understanding of the pathogenesis of *C. albicans*

**Keywords:** Dimorphism, proteinases, phospholipases, adhesins and *Candida albicans*

## INTRODUÇÃO

Entre a família dos fungos, o gênero *Candida* spp é o predominante na microbiota humana, sendo a *Candida albicans* (*C. albicans*) a espécie mais freqüente. As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta freqüência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população humana sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde <sup>(1)</sup>.

Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos <sup>(2)</sup>. Além destes fatores inerentes ao hospedeiro, existem algumas propriedades inerentes às células de *Candida* spp., comumente denominadas fatores de virulência, que lhes conferem a capacidade de produzir doença <sup>(3)</sup>.

A virulência do microrganismo é o resultado de uma multiplicidade de fatores que agem simultaneamente para vencer as defesas do hospedeiro. No caso da infecção por *Candida*, estes fatores podem estar correlacionados com a aderência à célula epitelial, ao dimorfismo, a capacidade de crescimento como blastoporos, pseudo-hifas e hifas, a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lisofosfolipases) <sup>(4)</sup> e a produção de endotoxinas de baixa e alta massa molecular, bem como a composição da parede celular, que facilita a adesão e a penetração através do tecido infectado. Sendo assim, a virulência da *C. albicans* resulta então da ação conjunta desses fatores contra as defesas do hospedeiro <sup>(5)</sup>.

Devido ao aumento de infecções oportunistas causadas por fungo, principalmente em indivíduos infectados pelo HIV, e a grande importância de *C. albicans* como agente patogênico, pesquisas tem sido realizadas para esclarecer os fatores de virulência e as circunstâncias da patogenicidade das várias espécies de *Candida*. Desse modo, o objetivo da presente pesquisa foi analisar artigos recentes sobre os principais fatores de virulência de *C. albicans* ressaltando que o conhecimento destes mecanismos envolvidos na fisiopatologia da candidíase, pode providenciar estratégias de prevenção e tratamentos.

## Fatores de Virulência

### *Dimorfismo*

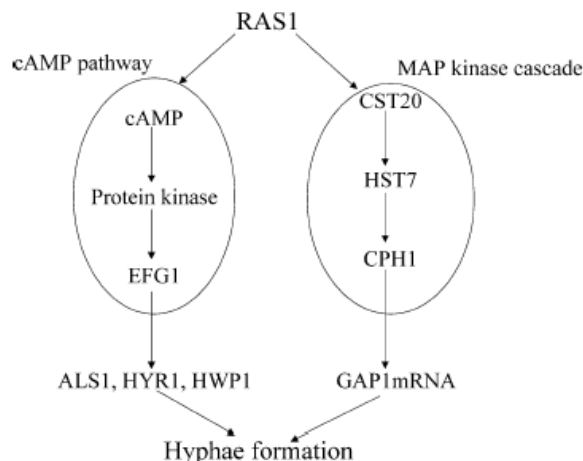
O dimorfismo é um dos mais importantes fatores de virulência da *C. albicans* <sup>(6; 7; 8)</sup>. De todas as *Candida spp.*, apenas *C. albicans* e *C. dubliniensis* formam ambos os tipos de crescimento filamentosos, hifas ou pseudohifas, e são definidas como polimórficas em seu padrão de crescimento <sup>(9; 10)</sup>.

O dimorfismo se caracteriza pela capacidade de crescimento do fungo sob duas formas: 1) Levedura unicelular esférica e 2) Forma filamentosa multicelular também chamada micelilal - hifas ou pseudohifas. Esta variação na sua morfologia é induzida por condições ambientais favoráveis no hospedeiro como alta temperatura, pH neutro, CO<sub>2</sub>, nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio e aminoácido), N-acetil-glicosamina, estágios de carência nutricional e soro <sup>(11; 8; 12)</sup>.

Em muitas lesões são encontradas ambas as formas morfológicas sugerindo que a propriedade dimórfica da *Candida* está envolvida na sua patogenicidade e ao amplo espectro de infecções associadas a este fungo. O tubo germinativo é a forma de transição entre leveduras e a forma filamentosa e ocorre no fluido biológico da infecção sendo um fator chave para a interação do fungo com o hospedeiro. A formação de pseudohifas ocorre pela divisão celular polarizada onde, a levedura cresce por brotamento e se alonga sem se destacar das células adjacentes <sup>(9)</sup>.

A grande virulência atribuída a transição levedura - tubo germinativo pode ser devido em parte a deficiência da indução para síntese de IL-12 pelo hospedeiro. A IL-12 é considerada uma citocina importante na defesa anticandidíase em níveis mucosos e sistêmicos. Experimentos evidenciaram que leveduras induzem a produção de IL-12 e IL-10 e células do tubo germinativo induzem predominantemente IL-10, citocina associada à candidíase em camundongos <sup>(13)</sup>. A formação do tubo germinativo e filamentação *in vivo* pode então prejudicar o desenvolvimento de uma resposta protetora contra os fungos. De acordo com Ariizumi et al. (2000), o receptor transmembranar tipo II Dectin-1 que contém um domínio extracelular de lectina tipo-C, é capaz de reconhecer somente a forma de levedura de *C. albicans* <sup>(14)</sup>. Este receptor de reconhecimento da imunidade inata é expresso em fagócitos incluindo macrófagos e células dendríticas e contribui para a resposta imunológica a  $\beta$ -glucana, um componente estrutural da parede celular dos fungos. A forma filamentosa da *Candida*, não expõe  $\beta$ -glucana na sua superfície e por isso não é reconhecida por este receptor <sup>(15; 16)</sup>.

Segundo Sato et al., (2004) a transição de *C. albicans* de leveduras para hifas é controlada por vários fatores de transcrição, incluindo os reguladores CPH1 e EFG1 que formam as duas vias de morfogênese conforme Figura 1 <sup>(17)</sup>.



**Figura 1.** Cascata de sinais de transdução para formação de hifas em *C. albicans*. Sato et al., 2004

**Fonte:**

A primeira destas vias inclui homólogos de *C. albicans* que corresponde ao STE 12, via de pseudohifas de *S. cerevisiae*. O homólogo de *C. albicans* de Ste12p é o CPH1 que é o regulador da proteína quinase mitógeno ativada e inclui Cst20, Hst7, Cek<sup>(11)</sup>. A segunda via de morfogênese é identificada pelo fator de transcrição EGF1, regulador da proteína quinase c-AMP (PKA) onde duas subunidades de PKA, Tpk1 e Tpk2, têm efeitos diferenciais na morfogênese hifal sob diferentes condições. Esta via é independente, mas paralela a via CPH1 e inclui homólogos de RAS, adenilciclase e proteína quinase-A. O regulador de transcrição hifal TEC1 é regulado por EGF1 e CPH2. RAS pode ativar ambas as vias CPH1 e EFG1<sup>(11; 18)</sup>.

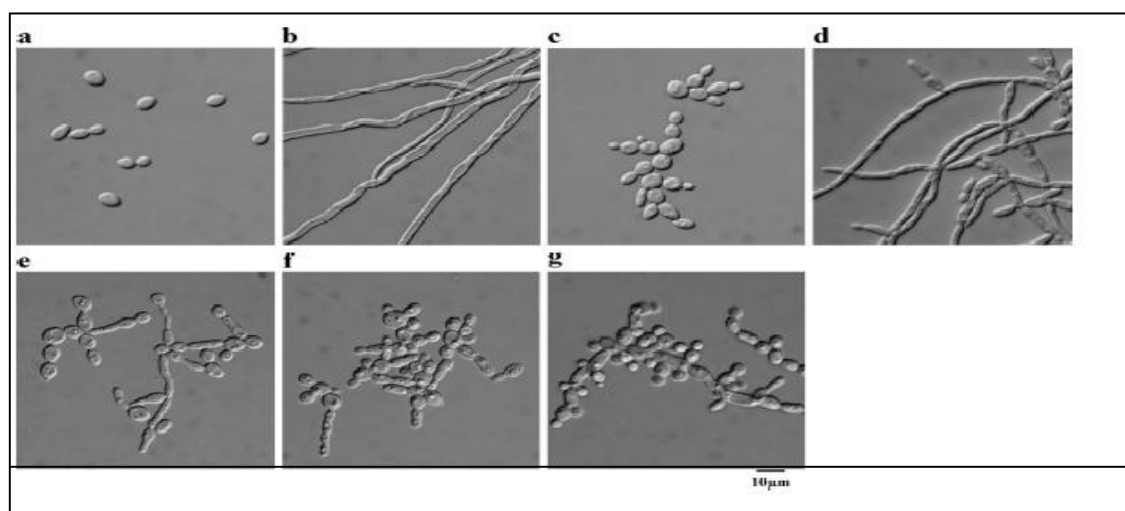
A função destes fatores na morfogênese e sua relevância para infecções de *Candida* são estudados em mutantes onde faltam o EGF1 funcional ou CPH1 ou ambos os fatores. Os resultados obtidos com estes mutantes sugerem que a falta de CPH1 diminuiu a capacidade de formação de hifas em meio sólido, enquanto que mutantes deficientes em EGF1 falharam em produzir hifas<sup>(6; 19)</sup>. Parece que outras vias são requeridas para morfogênese incluindo a integridade da parede celular, proteína quinase-c (PKC) e a via de osmoregulação-glicerol de alta osmolaridade-Hog 1. A função da via Hog1p em *C. albicans* não é totalmente relatado para osmoregulação, em vez disso, mutantes deletados em ambos *sln1* ou *ssk1* são defeituosos na filamentação<sup>(20)</sup>.

De acordo com Watanabe et al., (2006), a valinomicina e o miconazol inibem o crescimento hifal e induzem o crescimento de *C. albicans* para a forma de levedura, atuando na transição morfológica do fungo dimórfico conforme Figura 2<sup>(21)</sup>.

Estes compostos alteram a concentração de potássio intracelular e promovem a inibição do crescimento hifal. Porém, quando é adicionado soro ocorre um aumento do potássio intracelular bloqueando a ação da valinomicina no crescimento hifal. O miconazol é conhecido por inibir a biossíntese do ergosterol, componente da membrana celular do fungo, alterando a permeabilidade da membrana e promovendo um escape de íons positivos da célula.

Para o crescimento hifal da Fig. 2, as células foram cultivadas em meio SPG (0,17% de nitrogênio base para levedura, sem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>04</sub> e sem aminoácidos (Difco), 0,1% L-

proline, e 2,0% D-galactose, pH 5.0. A Tabela 1. compara a ação de vários compostos comprovando a atividade anti-hifal da valinomicina e miconazol para a *C. albicans*.



**Figura 2.** Morfologia de *C. albicans* incubadas a 30°C por 24 horas  
Meios usados: YPD (a), SPG (b), SPG + 1.0 g/ml de valinomicina (c), SPG + 10% FBS + 1.0 g/ml de valinomicina (d), SPG + 10% FBS + 10 g/ml de valinomicina (e), SPG + 0,04 g/ml de miconazol (f), e M-M-Lee (g)  
**Fonte:** Watanabe et al., 2006

**Tabela 1.** Efeitos de várias substâncias químicas na morfologia celular da *C. albicans* em meio SPG para crescimento hifal

| Substance             | Initial concentration (µg/ml) | Dilution |   |   |   |    |    |    |     |     |     |      |   |
|-----------------------|-------------------------------|----------|---|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|------|---|
|                       |                               | 1        | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 |   |
| Valinomycin           | 100                           | N        | Y | Y | Y | Y  | Y  | Y  | Y   | Y   | Y   | H    | H |
| Uncoupler             |                               |          |   |   |   |    |    |    |     |     |     |      |   |
| DNP                   | 125                           | N        | N | Y | Y | Y  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| FCCP                  | 125                           | N        | N | N | N | Y  | Y  | Y  | Y   | H   | H   | H    | H |
| Ionophore             |                               |          |   |   |   |    |    |    |     |     |     |      |   |
| Gramicidin D          | 100                           | N        | Y | Y | Y | H  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| Bis(12-crown-4)       | 66                            | N        | N | Y | Y | H  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| Proton pump inhibitor |                               |          |   |   |   |    |    |    |     |     |     |      |   |
| Lansoprazole          | 2.0                           | N        | Y | Y | Y | H  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| TBA                   | 2.0                           | N        | Y | Y | Y | H  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| Antifungal drug       |                               |          |   |   |   |    |    |    |     |     |     |      |   |
| Nystatin              | 10                            | N        | N | N | N | N  | N  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| Amphotericin B        | 1.25                          | N        | N | Y | H | H  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| 5-Fluorocytosine      | 2.0                           | N        | N | N | Y | Y  | H  | H  | H   | H   | H   | H    | H |
| Miconazole            | 2.0                           | N        | Y | Y | Y | Y  | Y  | Y  | Y   | Y   | H   | H    | H |

Y - leveduras, H - hifas, N - nenhum crescimento. Diluição 1 significa diluição inicial.

**Fonte:** Watanabe et al., 2006

## Aspartil Proteases

Embora a formação de hifas seja provavelmente a melhor determinante de virulência documentada de *C. albicans*, a natureza e o papel das enzimas hidrolíticas, especialmente a Aspartil Protease Secretora (*SAP*), tem sido os principais objetivos de estudos fisiológicos e bioquímicos desta espécie como sendo uma chave dos principais determinantes de virulência de *C. albicans*, devido sua capacidade de causar danos na integridade da estrutura de proteínas e afetar a arquitetura padrão dos tecidos<sup>(22; 23)</sup>.

A produção e secreção de proteases por espécies de *C. albicans* foi descrita pela primeira vez em 1965<sup>(24)</sup> e desde então vem sendo intensamente estudada por ser considerada um fator importante na patogenicidade de espécies de *Candida*<sup>(25; 23)</sup>.

As proteases são capazes de digerir proteínas do hospedeiro, invadir os tecidos através da degradação de imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento, e proteínas da matriz extracelular. As aspartil proteases (*SAP*) constituem uma família composta de várias isoenzimas, onde algumas (*SAP1-10*) são produzidas pelas espécies de *Candida*<sup>(22)</sup>. Estas enzimas são codificadas por uma família de 10 genes homólogos no qual são diferentemente regulados durante a infecção. Oito dessas proteases (*SAP1-8*) são secretadas para o espaço extracelular, enquanto as *SAP9* e *SAP10* estão ligadas a membrana via âncora de GPI<sup>(5)</sup>. Estudos anteriores revelaram a importância de determinados genes de *SAP* em relação aos vários modelos de infecção. Além disso, vários membros da família de genes poderiam ter seus próprios papéis no processo infeccioso, pois condições ambientais afetam a produção de diferentes *SAPs*, resultando em um nicho específico de expressão de genes *SAP* padrão<sup>(22)</sup>.

Naglik et al. (2004) em uma revisão da literatura que buscou explorar os papéis funcionais das proteinases de *C. albicans* e como elas contribuem com a interação hospedeiro/patógeno *in vivo*, observaram que a subfamília *SAP1-3* apresenta um grande espectro de atividade e são conhecidas por degradar muitas proteínas humanas de mucosas incluindo matriz extracelular. A eficiente remoção das barreiras do hospedeiro *in vivo* não seria apenas para providenciar nutrientes para a célula, mas também revelam um potencial sistema de ataque de *C. albicans*, de colonização e penetração dos tecidos do hospedeiro e possivelmente promovem disseminação de *C. albicans* pelo sistema circulatório. A subfamília de *SAP4-6* foi exclusivamente expressada durante a formação de hifas em pH próximo do neutro *in vitro*, sendo que podem também degradar os mesmos substratos que a *SAP1-3*. Porém, é provável que o alvo das subfamílias *SAP1-3* e *SAP4-6* sejam proteínas celulares e tecidos diferentes durante o processo infeccioso, que pode ser o resultado de diferenças na especificidade do substrato<sup>(4)</sup>.

Corroborando com estas informações Chen et al. (2002) realizaram um estudo para determinar se a produção e secreção de proteínas *SAP4-6* em *C. albicans* são diferentemente reguladas durante a formação de hifas de uma forma dependente de pH. Os resultados demonstraram claramente que a secreção de Sap5 em *C. albicans* foi induzida durante a formação de hifas, seguida pela secreção de *SAP4-6* em condições ácidas. Estes resultados sugerem então que a *SAP5* pode desenvolver um papel fundamental na fase inicial da infecção por *Candida*<sup>(26)</sup>.

Outro estudo realizado por Taylor et al. (2005) para analisar a expressão de genes das aspartil proteases durante o curso da infecção vaginal em camundongos e como esta expressão *in vivo* está associada com a formação de hifas, observou que dos seis genes que foram analisados (*SAP1-SAP6*), somente *SAP4* e *SAP5* foram detectavelmente induzidas durante a infecção no modelo utilizado. E a expressão de ambos os genes estava associado

com o crescimento de hifas embora nem todas as células com formação de hifas expressaram *SAP4* e *SAP5*. A expressão da *SAP5* foi induzida logo depois da infecção, enquanto que a *SAP4* foi expressa em tempos mais tardes e em menor número de células em comparação com a *SAP5*. Estes achados apontam para uma ligação entre o desenvolvimento morfo genético e a expressão de genes de virulência durante a candidíase vaginal em ratos, onde sinais do hospedeiro induzem tanto formação de hifas quanto a expressão de *SAP4* e *SAP5*, mas a expressão de genes padrões são, em última análise, controlada por outros fatores <sup>(22)</sup>.

Estas enzimas têm sido purificadas e caracterizadas, e isto tem providenciado uma maior descrição das características das isoenzimas *SAP*, as quais as propriedades bioquímicas em geral estão descritas na Tabela 2 <sup>(27)</sup>. Estas propriedades demonstram que o peso molecular pode variar entre 35 a 45kDa, possuem atividade proteolítica em pH baixo, em torno de 2,0 a 5,0, com uma especificidade bastante ampla, incluindo queratina, colágeno, albumina, hemoglobina, cadeia pesada de imonoglobulinas e proteínas de matriz extracelular <sup>(28)</sup>. Esta versatilidade nas propriedades pode providenciar sucesso vital de *C. albicans* como um patógeno oportunista, por permitir a sobrevivência deste fungo e causar infecções em uma variedade de diferentes tecidos assim como em numerosas superfícies mucosas, pele e órgãos internos <sup>(29)</sup>.

**Tabela 2.** Propriedades bioquímicas das proteases de *Candida albicans*

| Proteinase | Mol mass (kDa)         | pH range          | pH for optimal activity | Isoelectric point (pI) |
|------------|------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| Sap1       | 38, 40, 40             | 2.5–5.5           | 3.2–4.5                 | 4.0                    |
| Sap2       | 40, 41, 43, 45, 48, 49 | 2.5–5.5           | 3.2–3.5                 | 4.25, 4.4              |
| Sap3       | 41, 42                 | 2.0–5.0           | 3.2–3.5                 | 5.7                    |
| Sap4       | 40 <sup>a</sup>        | 4.0–7.0           | 5.0                     | ND                     |
| Sap5       | 37 <sup>a</sup>        | 3.0–7.0           | 5.0                     | ND                     |
| Sap6       | 40 <sup>a</sup>        | 3.0–7.0           | 5.0                     | ND                     |
| Sap7       | ND <sup>b</sup>        | ND <sup>b,c</sup> | ND <sup>b</sup>         | ND <sup>b</sup>        |
| Sap8       | 41                     | ND                | ND                      | ND                     |
| Sap9       | ND <sup>b</sup>        | ND <sup>b</sup>   | ND <sup>b</sup>         | ND <sup>b</sup>        |
| Sap10      | ND <sup>b</sup>        | ND <sup>b</sup>   | ND <sup>b</sup>         | ND <sup>b</sup>        |

Fonte: Naglik et al., 2003

A produção e secreção de proteases não é característica exclusiva de *C. albicans*. Todas as espécies de *Candida* até o presente momento estudadas, crescidas na presença de proteína com fonte de nitrogênio, são produtoras de proteases para o meio extracelular, o que faz com que este não seja um fator de virulência exclusivo de *C. albicans*. Oksuz et al. (2007) em um estudo para determinar *in vitro* a atividade de proteases em 122 isolados de *Candida spp* de vários locais de indivíduos saudáveis, verificaram que *C. albicans* foi a mais frequentemente isolada (66,4%) e das espécies não-*albicans* *C. glabrata* (7,3%), *C. tropicalis* (6,3) e *C. kefyr* (4,9%) foram as mais frequentes. Destes isolados 64 (52,4%) foram proteases positiva e uma pequena quantidade de espécies de não-*albicans*. A

atividade de proteases foi detectado em 46 (56,7%) das *C. albicans* testadas e em maior frequência na região urogenital (55,1) e na pele (58,8) <sup>(28)</sup>.

As aspartil proteases, além de serem um importante fator de virulência de *Candida albicans* durante a infecção de mucosas e candidíase disseminada, elas podem contribuir para a indução de resposta inflamatória no hospedeiro.

Schaller et al. (2005) realizaram um estudo utilizando um modelo de candidíase vaginal *in vitro* para estudar o impacto global da atividade proteolítica das distintas isoenzimas de *SAP*. Os resultados mostraram que a infecção por *C. albicans* nos camundongos selvagens induziram a produção de interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, fator de estimulação de colônia de macrófago, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em comparação com a expressão de citocinas nos tecidos não infectados. E que quando adicionado o inibidor de aspartil protease (Pepstatina A), houve uma estranha redução da resposta das citocinas no tecido infectado, indicando que a resposta imune é afetada pela atividade proteolítica do agente patogênico <sup>(5)</sup>.

No mesmo trabalho verificaram, que as aspartil proteases secretadas por *C. albicans*, especialmente *SAP1* e *SAP2*, podem induzir a resposta de citocinas próinflamatórias causando um dano tecidual no modelo de candidíase vaginal, por outro lado a *SAP4* e *SAP6* não desenvolveram a mesma resposta. Estes resultados refletem a capacidade das células epiteliais para responder aos fatores de virulência de *C. albicans* (e outros patógenos) pela secreção de citocinas padrão de resposta Th1, na qual podem iniciar a quimioatração e resposta imune protetora na presença de células efectoras assim como neutrófilos e linfócitos *in vivo* <sup>(5)</sup>.

A presença da família de genes de *Sap* em *C. albicans* claramente providencia aos fungos um eficiente e flexível sistema proteolítico que pode ser vital para seu sucesso como um patógeno oportunista. A produção de *Sap* é provavelmente um processo bem regulado que é ativado em momentos específicos durante a colonização e infecção para obter benefício máximo para *C. albicans*.

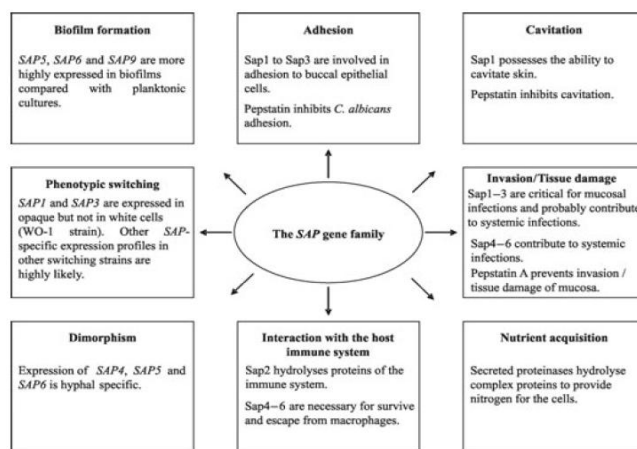
Devido às aspartil proteases serem um importante fator de virulência para este fungo, inibidores dos genes que codificam estas proteases, poderiam ser utilizadas como novos agentes antifúngicos para o tratamento de infecções por *C. albicans*.

Staib et al. (2008) realizaram um estudo com um inibidor de protease a pepstatina, e inibidores de proteases do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e verificaram que enquanto a pepstatina bloqueou a atividade de todas as *SAPs* testadas (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP6*, *SAP8* e *SAP9*), os inibidores de proteases do HIV, ritonavir e saquinavir inibiram a expressão de *SAP1* e *SAP3*, mas não a expressão de outras *SAPs*. Portanto o conjunto pode ser usado para testar a atividade de novos inibidores de proteases contra isoenzimas *SAPs* individuais pela sua capacidade de bloquear o crescimento do patógeno, pois compostos que atuem especificadamente sobre determinadas *SAPs* de *C. albicans* seriam candidatas promissoras no tratamento de infecções por este fungo patogênico, no futuro <sup>(23)</sup>.

A patogenicidade de *C. albicans* é um processo multifatorial que é regulado por uma rede de fatores de virulência. A produção de uma família de aspartil protease indica que estas enzimas atuam para maximizar os benefícios para que *C. albicans* infecte vários outros locais. A produção de *SAP* parece ser um processo altamente regulado, o que provavelmente reflete em processos de transcrição de co-regulação com outros atributos de virulência que possuem múltiplas funções *in vivo*, como demonstrado na Fig 3 <sup>(4)</sup>. As aspartil proteases desenvolvem um papel importante na patogenicidade das espécies de



*Candida*. As SAPs claramente providenciam para este fungo um eficiente e flexível sistema proteolítico que pode promover o sucesso vital deste patógeno como patógeno oportunista e pode parcialmente explicar porque *C. albicans* é um fungo patogênico comum nos humanos.



**Figura 3.** Modelo hipotético para a correlação da expressão de genes SAP com a patogenicidade em *C. albicans*.

Fonte: Naglik et al., 2004

### Fosfolipases

A secreção de fosfolipase por *C. albicans* é considerada um atributo chave para a invasão da mucosa epitelial, por catalisarem a hidrólise de fosfolipídios. A literatura apresenta número contraditório de genes que ativam a produção de fosfolipases, mas muitos já são descritos como PLB1, PLB2, PLC1 e PLD1<sup>(30)</sup>.

A fosfolipase B1, B2, C e D de *C. albicans* tem um papel significativo no processo de invasão do hospedeiro, mas como cada uma delas age ainda não está bem esclarecido. Samaranyake et al (2006) mostraram que estas fosfolipases têm papel fundamental no crescimento da *C. albicans* e assim modulam a doença *in vivo*<sup>(30)</sup>. Estudos mostram a participação das fosfolipases nos fatores de virulência da *C. albicans* nas mais diversas localizações, como na cavidade oral, nas fezes, no sistema urogenital e pele<sup>(28)</sup>.

Sugita et al (2002) sugerem que o genótipo da *C. albicans* deve ser analisado para se avaliar os fatores de virulência, pois, em seu estudo, verificaram que as que têm genes 26S rRNA “intron-containing” apresentam atividade mais alta de fosfolipases do que as que não apresentam o mesmo gene “intronless”<sup>(31)</sup>.

A pesquisa realizada por Mukherjee et al (2003) analisou fatores que afetam a expressão do gene PLB1 da *C. albicans* e demonstrou que ele estava presente no crescimento deste fungo e que glicose e fosfolipídios eram essenciais para a indução da expressão<sup>(32)</sup>.

Samaranayake et al. (2005) correlacionaram à expressão de genes da enzima fosfolipase B com quatro fatores de virulência como a formação do tubo germinativo, hidrofobicidade da superfície celular, adesão a células epiteliais e produção de hemolisina em pacientes com HIV<sup>(33)</sup>. Entretanto, Oksuz, et al (2007), relataram a presença de alta concentração de fosfolipases em amostras de *C. albicans* mesmo em indivíduos saudáveis<sup>(28)</sup>.

Gokce et al (2007) analisaram amostras de sangue de cultura de *C. albicans* e encontraram alta produção de fosfolipases que poderia ser um dos fatores de virulência para a infecção hematogênica<sup>(34)</sup>. Kadir et al. (2007) avaliaram a atividade das fosfolipases de amostras de *C. albicans* da mucosa oral de pacientes com estomatite dentária ou saudáveis e encontraram uma maior atividade nos indivíduos com estomatite dentária ( $p < 0,05$ )<sup>(35)</sup>.

Borstt & Fluit (2003) analisaram amostras de *C. albicans* do trato respiratório de pacientes com infecção respiratória e detectaram mais fosfolipase que no sangue e outros tecidos, sendo correlacionado com origem primária da cavidade oral<sup>(36)</sup>.

Estudos realizados por Choi et al. (2007) mostraram função protetora do PAF na infecção por *Candida* no sistema murino pela indução de produção de citocinas pró-inflamatórias anticandida, como o TNF- $\alpha$ . Eles demonstraram que o PAF produzido endogenamente em resposta a *C. albicans* induz a ativação precoce do NF-kB com liberação de TNF- $\alpha$ , o que leva a resistência dos animais aos fungos. Entretanto, órgãos sensíveis, como os rins, perdem a capacidade de gerar PAF suficiente, pela resposta precoce do NF-kB, sugerindo que a via de produção de PAF deve ser prejudicial aos rins<sup>(37)</sup>.

Devido à fosfolipase ser um importante fator de virulência, algumas antifúngicos têm sido testados com o intuito de limitar sua ação. Silva et al. (2007) estudaram 37 cepas de *Candida sp* e detectaram proteinases em 100%, e destas, 83,8% eram fosfolipases positivas, sendo todas sensíveis ao Fluconazol e ao Itraconazol<sup>(1)</sup>.

Em uma outra pesquisa, Kadir et al. (2007) verificou que o Clorexidina foi capaz de suprimir a patogenicidade da *C. albicans* através da modulação da atividade da fosfolipase mesmo em doses subterapêuticas<sup>(35)</sup>.

## Adesinas

Em *Candida albicans*, os componentes do organismo que promovem o reconhecimento e colonização de tecidos do hospedeiro são referidos como adesinas e constituem fator chave na manutenção dos estados comensais e patogênico<sup>(38)</sup>. A aderência ao tecido hospedeiro é feita por uma combinação de interações específicas e não específicas como as interações eletrostáticas e hidrofóbicas da superfície celular<sup>(39)</sup>.

Como citado por Calderone e Gow (2002) foi evidenciado através de ensaios com leveduras marcadas com elemento radiativo e adicionadas às células bucais ou de mucosa vaginal que as *C. albicans* eram as mais aderentes de todas as espécies testadas, estes ensaios foram realizados por King et al. (1980) e provavelmente foram os primeiros a demonstrar a importância da adesão na virulência de *C. albicans*<sup>(40; 41)</sup>.

As interações de *C. albicans* com a superfície da célula do hospedeiro são mediadas por componentes da parede celular como glucana, quitina e manoproteínas<sup>(42)</sup>. Segundo Ribeiro et al. (2007) a formação dos tubos germinativos, no qual a *Candida* passa da forma leveduriforme para a forma filamentosa, favorece a capacidade de aderência de *C. albicans* que envolve por parte do fungo, glicoproteínas de superfície, proteínas do tipo lectinas, que

reconhecem diferentes tipos de carboidratos e receptores para a fração C3b do sistema complemento, e por parte das células epiteliais do hospedeiro, receptores para as adesinas de *Candida* como fibronectina, fibrina e laminina <sup>(43)</sup>.

Uma adesina bem caracterizada de *C. albicans* é a proteína Hwp 1. É uma proteína da superfície celular expressa apenas nas hifas, e que, através de sua ligação com glicosilphosphatidilinositol (GPI) está covalentemente ligada a glucana da parede celular do fungo. A Hwp 1 é requerida para a aderência às células epiteliais orais. STAAB et al. (1999) demonstraram que a inativação do gene *HWPI* gera células fúngicas incapazes de formar complexos estáveis com as células epiteliais bucais do hospedeiro. Além disso, esses mutantes apresentam capacidade reduzida em causar candidíase sistêmica em camundongos <sup>(44)</sup>. O domínio N-terminal de Hwp 1 serve como um substrato para as transglutaminases de mamíferos, o qual faz uma ligação cruzada covalentemente da Hwp 1 com as proteínas da superfície das células do hospedeiro <sup>(45)</sup>.

Grande parte das infecções por *Candida* spp. está associada com a formação de biofilme na superfície de materiais médicos ou epitélio do hospedeiro. Hwp 1 é a primeira adesina de *C. albicans* necessária para formar o biofilme, e dependente de Bcr 1 (regulador chave da formação do biofilme, pois estimula a expressão de genes de adesinas). Mutantes homocigotos que não expressam Hwp 1 produzem um biofilme fino com pouca massa de hifas. Entretanto, mutantes que não expressam Bcr 1, mas super expressam Hwp 1, aumentam a aderência das células ao hospedeiro <sup>(44)</sup>. As células que constituem o biofilme apresentam resistência aos agentes antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro que são de importância do ponto de vista clínico <sup>(46)</sup>.

Outras proteínas de superfície celular com propriedade de adesinas são as proteínas ligadas às  $\beta$  1,6-glucanas da parede celular codificadas por uma família de 8 genes ALS (agglutinin-like sequence) ALS1 a ALS7 e ALS9 <sup>(47)</sup>.

Als5p media a adesão inicial da levedura a substratos cobertos com proteínas da matrix celular e com células epiteliais humanas, a aderência mediada por esta proteína ocorre dentro de minutos e é forte o suficiente para resistir à agitação e é reversivelmente inibida por agentes desnaturantes como formaldeído, pH alto ou uréia <sup>(48)</sup>. Experimentos com cepas mutantes de *C. albicans* para ALS trouxe informações sobre as diferentes proteínas desta família. Com relação a Als1p, Kamai et al. (2002), demonstraram em modelo experimental de candidíase oral em camundongos, que células de *C. albicans* nocaute para ALS1 aderiam menos do que cepas selvagens, mostrando a importância desta proteína no processo de aderência tanto *in vitro* com *in vivo* <sup>(49)</sup>. Cepas mutantes ALS3 em ensaios de adesão apresentavam menor adesão tanto em células endoteliais da veia umbilical humana como em células epiteliais bucais, mas não a placas plásticas cobertas com fibronectina <sup>(50)</sup>. ZHAO et al. (2007) demonstraram que células nocautes ALS9 apresentaram significativamente menor adesão do fungo a monocamadas de células endoteliais vasculares <sup>(51)</sup>.

Li e Pelecek em 2003 identificaram o gene EAP1 de *C. albicans* que codifica uma proteína da superfície celular, com propriedade de adesina, ancorada ao GPI covalentemente ligada a glucana da parede celular do fungo. Os autores verificaram que quando este gene é expresso em *S. cerevisiae* aumenta a adesão em células epiteliais humanas e em poliestireno além de restaurar o crescimento invasivo haplóide e formação de pseudohifa diplóide em *S. cerevisiae* deficiente em adesão <sup>(52)</sup>. Esta proteína pode também ser requerida para a formação de biofilmes, desde que os autores verificaram que

*C. albicans* mutantes para essa proteína não desenvolviam biofilme em *in vitro* e *in vivo* em cateter venoso central<sup>(53)</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva J, Ferreira JC, Candido RC. Enzymatic activity, slime production and antifungal agent sensitivity of *Candida* sp. Rev Soc Bras Med Trop. V. 40, no. 3, p. 354-355, Maio/Jun, 2007.
  2. Ribeiro EL, Guimarães RI, Inácio MCC, Ferreira WM, Cardoso CG, Dias SMS, Naves PLF. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. NewsLab. Ed. 64, p 106-128, 2004.
  3. Hruskova HO. Secreted proteins of *Candida albicans*. Front Biosci. V. 13, p. 7227-7242, Maio, 2008.
  4. Naglik J, Albrecht A, Bader O. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol, v. 6, n. 10, p. 915-26, 2004.
  5. Schaller M, Korting HC, Borelli C, Hamm G, Hube B. *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinases Modify the Epithelial Cytokine Response in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis. Infection and Immunity. v. 73, no 5, p. 2758-2765, Maio, 2005.
  6. Brown AJP & Gow NAR. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol. v. 7, p. 333-338, 1999.
  7. Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. Microbiology. v. 146, p. 1763-1774, 2000.
  8. Calderone R A & Fonzi AW. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology Rev. v. 9, p. 327-335, 2001.
  9. Odds FC. *Candida* and Candidosis (2nd edn). Baillière Tindall, p. 42-59, 1988.
  10. Sudbery EP, Gow AN, Berman J. The distinct morphogenetic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 12:317-324, 2004.
  11. Lo HJ, Köhler JR, Di Domenico B, Loebenberg D, Cacciaiupuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent Cell. v. 90, p. 939-949, 1997.
  12. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribol JL. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. Eukaryot Cell. v. 2, p. 1053-1060, 2003.
  13. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. Clin Microbiol. Rev. v. 10, p. 611-636, 1997
- Biosaúde*, Londrina, v. 14, n. 1, 2012

14. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takasima A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol Chem.* v. 275, p. 20157-20167, 2000.
15. Smits G J, Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol.* v. 2, p. 348-352, 1999.
16. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* v. 19, p. 311-315, 2003.
17. Sato T, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans*, Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biol. Pharm. Bull.* V. 27, no. 5, p. 751-752, Maio, 2004.
18. Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen W, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 64, p. 746-785, 2000.
19. Dieterich C, Schandar M, Noll M, Johannes FJ, Brunner H, Graeve T, Rupp S. In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EGF1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology.* v. 148, p. 497-506, 2002.
20. Navarro-Garcia F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. A role for the Map kinase MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology.* v. 144, p. 411-424, 1998.
21. Watanabe H, Azuma M, Igarashi K, Ooshima H. Relationship between Cell Morphology and intracellular Potassium Concentration in *Candida albicans*. *J. Antibiot.* V. 59, no. 5, p. 281-287, 2006.
22. Taylor BN, Staib P, Binder A, Biesecker A, Sehnal M, Rollinghoff M, Morschhauser J, Schroppel K. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during Vaginal Infection. *Infection and Immunity.* v. 73, no 3, p. 1828–1835, Mar. 2005
23. Staib P, Lermann U, Warmuth J, Degel B, Wurzner R, Monod M, Schirmeister T, Morschhauser J. Tetracycline-Inducible Expression of Individual Secreted Aspartic Proteases in *Candida albicans* Allows Isoenzyme-Specific Inhibitor Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* V. 52, no. 1, p. 146-156, Jan, 2008.
24. Staib, F. Serum-proteins a nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia.* V. 4, P. 187-193, 1965.
25. Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model

of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* v. 71, p. 3227–3234, 2003.

26. Chen YC, Wu CC, Chung WL, Lee FJS. Differential secretion of Sap4–6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology.* v. 148, p. 3743–3754, 2002.

27. Naglik J R, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* v. 67, no. 3, p. 400-428, Set. 2003.

28. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, Koc AN. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis.* v. 60, no. 5, p. 280-283, Set, 2007.

29. Tosun I, Aydin F, Kaklikkaya N, Erturk M. Induction of secretory aspartyl proteinase of *Candida albicans* by HIV-1 but not HSV-2 or some other microorganisms associated with vaginal environment. *Mycopathologia.* V. 159, p. 213–218, 2005.

30. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA, Cheung BP, Yau JY, Yeung KW, Samaranayake LP. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS.* v. 114, no. 12, p. 857-866, Dec, 2006.

31. Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* v. 46, no. 12, p. 881-883, 2002.

32. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology.*; v. 149, p. 261-267, Jan, 2003.

33. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA, Cheung BP, Yau JY, Yeung KW, Samaranayake LP. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol.* v. 54, p. 583-593, Jun, 2005.

34. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.*; v. 164, no. 6, p. 265-269. Dez, 2007.

35. Kadir T, Gumru B, Uygun CB. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol.* v. 52, no. 7, p. 691-696, Jul, 2007.

36. Borst A & Fluit AD. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiology.* v. 52, p. 971-974, 2003.

37. Choi JH, Choi EK, Park SJ, Ko HM, Han SJ, Im SY. Impairment of p38 MAPK-mediated cytosolic phospholipase A2 activation in the kidneys is associated with pathogenicity of *Candida albicans*. *Immunology*. V. 120, no. 2, p. 173.-181, Feb, 2007.
38. Rauceo JM, Armond R, Otoo H, Kahn PC, Klotz SA, Gaur NK, Lipke PN. Threonine-Rich Repeats Increase Fibronectin Binding in the *Candida albicans* Adhesin Als5p $\nabla$ . *Eukaryot Cell*. V. 5, no. 10, p. 1664–1673, 2006.
39. Cotter G & Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Journal of Biomedical Science*. v. 57, p. 241-249, 2000.
40. Calderone RA & Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In: Calderone R.A. (Eds). *Candida and Candidiasis*, ASM Press, Washington D. C., p. 67-86, 2002.
41. King RD, Lee JC, Marris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* v. 27, p. 667-674, 1980.
42. Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, Athis P, Poulain D, Bonnin A.  $\beta$ -1,2- and  $\alpha$ -1,2-Linked Oligomannosides Mediate Adherence of *Candida albicans* Blastospores to Human Enterocytes In Vitro. *Infection and Immunity*. v. 71, no. 12, p. 7061-7068, 2003.
43. Ribeiro EL, Campos CC, Cardoso CG, Ferreira WM, Pimenta FC, Toledo OA. Buccal *Candida albicans* of children with down's syndrome: behavior of germ tubes, exoenzymes and sensibility to killer toxins. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*. v. 22, no. 57, p. 243- 249, 2007.
44. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, v. 283, p. 1535-1538, 1999.
45. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. *Eukaryotic Cell*, v. 5, no. 10, p. 1604–1610, 2006.
46. Bizerra FC. Características da formação do biofilme de *Candida tropicalis* e resistência a antifúngicos. *Biblioteca digital UEL*, 2006.
47. Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.*, v. 33, p. 451-459, 1998.
48. Gauer N, Klotz S, Henderson R. Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* V. 67, p. 6040–6047, 1999.

49. Kamai YM, Kubota Y, Kamai T, Hosokawa T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect. Immun.* V. 70, p. 5256–5258, 2002.
50. Zhao X, Oh S-H, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJP, Hoyer LL. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology.* v. 150, p. 2415–2428, 2004.
51. Zhao X, Oh S-H, Hoyer LL. Unequal contribution of ALS9 alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology.* v. 153, p. 2342–2350, 2007.
52. Li F & Palecek SP. EAP1, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. *Eukaryotic Cell*, v. 2, no. 6, p. 1266–1273, 2003
53. Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, Andes D, Palecek SP. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *Eukaryotic Cell*, v. 6, no. 6, p. 931–939, 2007.