

Atividade de aspartil proteinases por isolados de *Candida* de pacientes HIV+

Activity of Aspartyl Proteinases by *Candida* isolates from HIV+ individuals

Almeida, R. S. C.¹; Gaziri, D.A.¹; Pongelupe, R.C.S.¹;
Gaziri L. C. J.²; Felipe I.

Resumo

Neste trabalho tivemos como objetivos a identificação de espécies do gênero *Candida* de 17 isolados de lesões pseudomembranosas presentes na superfície da cavidade oral de pacientes HIV+, internados no Hospital Universitário (HURNP), e análise da produção de proteinases. Os isolados foram cultivados em caldo Sabouraud dextrose 28°C por 48 horas. As espécies de *Candida* foram identificadas por CHROM-agar candida. A frequência das espécies foi de 41,18% *Candida albicans*, 29,41% *Candida tropicalis*, 17,65% *Candida krusei* e 11,76% *Candida glabrata*. A análise da produção de proteinases foi realizada em meio Agar contendo vitaminas, sais minerais, glicose e albumina como fonte de nitrogênio. A degradação de albumina pela produção de proteinases gerou a formação de um halo, revelado com negro de amido. A atividade (Pz) foi obtida através da razão entre o diâmetro do disco contendo as colônias de *Candida* (6mm) e o diâmetro do disco mais a zona de degradação da albumina conforme os códigos: PZ= 1,0 atividade enzimática negativa, e entre 0,4 e 1,0 positiva. Todos os isolados de *Candida* exibiram atividade de proteinase.

Palavras-chave: *Candida*, proteinase, patogenicidade

Abstract

We identified *Candida* species from 17 isolates obtained from pseudo-membranous lesions in the oral cavity of HIV+ inmates at the University Hospital (HURNP), and analyzed the proteinase activity of those isolates.

¹ Departamentos de Ciências Patológicas¹ e de Ciências Fisiológicas², Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Ionice Felipe Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR, Brasil. Tel. and Fax: (43) 3371-4267. E-mail: ionice@uel.br

The isolates were grown in Sabouraud dextrose at 28°C for 48h, and the species were identified through CHROM-agar. The species identified were *C. albicans* (41.18%), *C. tropicalis* (29.41%), *C. krusei* (17.65%) and *C. glabrata* (11.76%). Analysis of proteinases activity was carried out in Agar supplemented with vitamins, salts, glucose, and albumin as a nitrogen source. Albumin degradation produced a halo whose size is a measure of proteinase activity, after staining by amido black. Activity (PZ) was defined as the ratio between the diameter of the disc (6mm) containing the *Candida* colonies and that value plus the length of the albumin degradation halo; PZ=1 was defined as absence of enzymatic activity, and PZ between 0.4 and 1 as positive. All *Candida* isolates presented proteinase activity.

Key words: *Candida*, proteinases, pathogenicity.

INTRODUÇÃO

Candida albicans é um comensal das mucosas oral, gástrica e vaginal ^(1,2) É um fungo extremamente adaptado às condições ambientais, crescendo em extremos de pH, mas embora a princípio inócuo, ao menor sinal de desequilíbrio orgânico e enfraquecimento do sistema imune torna-se potencialmente patogênico ^(3,4).

Na candidíase orofaríngea ocorrem várias apresentações. Há formação de placas esbranquiçadas pseudomembranosas na mucosa bucal, orofarínge e língua, lesões eritematosas no palato e orofarínge e candidíase atrófica. Em casos mais brandos, ocorre queilite nas comissuras labiais ⁽¹⁾.

A proliferação de *C. albicans* nas mucosas depende também de fatores ambientais. Assim, a divisão de nutrientes com a microbiota local, a presença de IgA secretora e mucinas asseguram o controle no número de leveduras e da germinação ⁽³⁾. Os fluxos salivares, gástricos e vaginais dificultam mecanicamente a adesão de *C. albicans* ⁽¹⁾ O advento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos nos hospitais faz com que o uso dos antibióticos seja elevado e por vezes

indiscriminado, contribuindo para diminuição da microbiota normal, favorecendo a proliferação da *C. albicans*.

Indivíduos HIV-positivos (HIV⁺) são especialmente vulneráveis a infecções das mucosas por *C. albicans*. Candidíase orofaríngea ocorre em 90% desses pacientes ao menos uma vez no curso da AIDS ⁽⁵⁾ O vírus HIV pode favorecer a ocorrência da candidíase por diversos fatores, tais como: alterações das células epiteliais de mucosas, redução da imunidade celular e humoral, além da modificação da microbiota oral por uso prolongado de antibióticos ⁽⁶⁾.

Este estudo teve como objetivos identificar as espécies de *Candida* e avaliar a produção de aspartilproteases de 17 isolados de *Candida* provenientes de infecções orais de pacientes HIV+ internados no Hospital Universitário do Norte do Paraná no Setor de Moléstias Infecciosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de Candida

Isolados de *Candida* de paciente HIV+ com infecção oral ou esofágica foram identificadas através de cultivo em soro de cavalo com avaliação de formação de tubo germinativo e posteriormente confirmado por cultivo em Chromoagar (Probac, São Paulo, Brasil). As cepas de *C. albicans* foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose. Para os experimentos, foram transferidas alçadas do estoque para meio Sabouraud-dextrose e incubado a 28°C. Através deste procedimento obteve-se uma cultura com aproximadamente 95% de blastoconídios ⁽⁷⁾. As células obtidas após 48 horas de crescimento foram lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0, e contadas em câmara de Neubauer. Conhecendo-se a concentração de leveduras, as diluições necessárias foram feitas.

Avaliação da atividade de proteinases

A produção de proteases foi avaliada usando a técnica ⁽⁸⁾ de Ruchel et al. (1982), após cultivo de cada amostra em Sabouraud-dextrose por 48 horas a 28°C. Para cada isolado foi definido em 4×10^7 contando-se em câmara de Neubauer. A seguir, discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm foram colocadas na suspensão de células para adsorção das mesmas e incubados por 30 minutos a 37°C. Placas com meio mínimo foram preparadas ⁽⁹⁾, contendo apenas albumina como fonte de nitrogênio e sobre estas foram adicionados os discos com células de *Candida* adsorvidas. Após 7 dias de incubação à 37°C foi feita a coloração com negro de amido a 0,1% em ácido acético, seguido do uso de solução reveladora. Os halos de degradação de albumina por proteases ficam bem evidenciados sendo possível medir os diâmetros dos mesmos. A atividade (Pz) foi obtida através da razão entre o diâmetro do disco contendo as colônias de *Candida* (6mm) e o diâmetro do disco mais a zona de degradação da albumina conforme os códigos: PZ= 1.0 atividade enzimática negativa, e positiva PZ entre 0,40 e 1,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos em nosso laboratório demonstraram a produção de proteinases como mecanismo de escape do sistema imune e assim, Andrade & Felipe (1992) evidenciaram *in vitro* a participação de proteinases de *C. albicans* na morte precoce de macrófagos peritoneais, e a adição de albumina ou pepstatina ao meio de incubação protegeu as células fagocíticas dos efeitos deletérios das proteinases ⁽⁷⁾. Sobrenadantes de cultura de *C. albicans* quando co-incubado com soro fresco de camundongo degradaram componentes do complemento

levando a redução opsonica deste soro ⁽¹⁰⁾. Recentemente, verificou-se a participação de proteinases do isolado (CR1) na indução de apoptose de macrófagos *in vitro* ⁽¹¹⁾ e em macrófagos durante infecção *i.p.* em camundongos, que foi abolido com pré-incubação do patógeno com pepstatina, um inibidor de proteinases ácidas ⁽¹²⁾

Tratamento com inibidores de proteases diminuiu a adesão de *C. albicans* em células epiteliais, mostrando serem essas enzimas importantes para uma efetiva adesão. Utilizando-se inibidores para as proteases produzidas pelo HIV, verificou-se também inibição das SAPs ^(13,14). Pacientes aids submetidos à terapia antiretroviral com inibidores de proteases do HIV (ritonavir, indinavir) recuperaram-se dos episódios de candidíase orogástrica, evidenciando a contribuição das proteases para virulência da *C. albicans* ⁽¹⁵⁾.

Cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV⁺ produzem maiores quantidades de proteinases que cepas de indivíduos saudáveis ^(16,17,18). Experimentos realizados por Gruber et al (1998) revelaram que as proteínas virais gp160 e gp41 do HIV aumentaram a produção de aspartilproteinases em *C. albicans* ⁽¹⁹⁾

Em modelos de infecções disseminadas em camundongos, a expressão da SAP2 foi observada somente após disseminação e invasão dos órgãos. Em contraste, em modelo de infecção orofaríngea em camundongos, onde disseminação não ocorre, SAP2 foi encontrada a qualquer tempo ⁽²⁰⁾. As SAP4-6 são produzidas durante a fagocitose por macrófagos murinos ⁽²¹⁾.

Durante a transição para hifas, em pH neutro, sondas de DNA hibridizam com as SAPs 4, 5 e 6 ^(22,23). SAPs 8 e 9 foram expressas em maior quantidade a 25°C que a 37°C, mas enquanto o mRNA do gene SAP8 é abundante na fase exponencial, SAP9 o é na fase estacionária, aproximadamente em 45 hs ⁽²³⁾. Em um modelo de candidíase oral, a expressão

das SAPs seguiu a seguinte ordem: SAP1 e 3>SAP6>SAP2>SAP8⁽²²⁾. Embora haja extenso conhecimento sobre indução da expressão de SAPs *in vitro*, a ativação dos genes por fatores do hospedeiro *in vivo* permanece pouco conhecida⁽²⁰⁾.

Proteinases aspárticas produzidas por *C. albicans* são codificadas por uma família de genes que contêm informações para ao menos 10 tipos de SAPs. O pH de atividade ótima para cada Sap tem alguma importância fisiológica porque a expressão individual de gen Sap é induzida em diferente pH. Sap 2 e 3 são conhecidos para serem induzidos entre pH 4,0 e 5,5 enquanto Sap 1 e Sap 6 são mais estáveis em pH neutro ou soluções fracamente alcalinas e podem contribuir com estágios relacionados a virulência⁽²⁴⁾. Portanto, a regulação temporal e específica da expressão das Saps pode ser importante para a sobrevivência de *C. albicans* no seu microambiente e assim na patogenicidade do fungo⁽²⁵⁾.

Em nossos estudos verificou-se *in vitro* a produção de proteinases por espécies de *Candida* (Tabela I). A frequência de *C. albicans* foi de 41.18%, a de *C. tropicalis* foi de 29.41% e as demais espécies compreenderam 17.65% para *C. kruzei* e 11.76% para *C. glabata* de acordo com a identificação através de CHROMagar. Todos isolados de *Candida* foram obtidos de pacientes HIV+ antes do tratamento com anti-fúngicos e com a taxa de linfócitos T CD4 abaixo de 300/dl. Segundo Naglik et al., 2003 mudanças nas células epiteliais de mucosa, alterações de microbiota oral, reduzida taxa de fluxo salivar assim como, impedida imunidade humoral e celular de mucosas podem contribuir com o microambiente e seleção de cepas de *Candida* com aumentada patogenicidade⁽⁶⁾. Estudos em andamento estão sendo realizados para verificar o potencial patogênico de cada isolado durante infecção em camundongos.

Tabela 1. Os isolados de *Candida* foram estriados dos em Agar- Sabouraud e plaqueados (1 colônia por isolado) em CHROMagar e identificados pelo fenótipo e cor das colônias. A atividade de proteinase foi avaliada como descrito em Materiais e Métodos.FCF14-1, mutante deficiente em proteinase (padrão negativo).

Isolados	CHROMagar	Gênero-spécie	Protease (PZ)
CR1	Verde Esmeralda	<i>Candida albicans</i>	0,68
CR4	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,69
CR5	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,49
CR6-2	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,69
CR7	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,60
CR14	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,63
CR15	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,52
CR16	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,50
CR17	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,58
CR19	Verde Esmeralda	<i>C. albicans</i>	0,49
CR2	Azul Cinzento	<i>Candida tropicalis</i>	0,87
CR3	Azul Cinzento	<i>C. tropicalis</i>	0,83
CR13	Azul Cinzento	<i>C. tropicalis</i>	0,66
CR6-1	Rosa, rugosa	<i>Candida krusei</i>	0,46
CR20	Rosa, rugosa	<i>C. krusei</i>	0,40
CR21	Rosa, rugosa	<i>C. krusei</i>	0,41
CR6-3	Lilás	<i>Candida glabrata</i>	0,80
FCF14-1	Verde Esmeralda	<i>Candida albicans</i>	1,0

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Vânia D'arc pela excelente assistência técnica. O trabalho foi realizado com apoio do CNPq fornecendo bolsas à De Almeida RSC, Gaziri DA e auxílio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Cannon, RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit. Rev. Oral Biol. Med.1999; 10: 359-383.
2. Xu J, Boyd C M, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. J. Clin. Microbiol.1999; 37: 3835-3843.
3. Senet JM. Risk factors and physiopathology of candidiasis . Reev. Iberoam. Mycol. 1997; 14:6-13.
4. Calderone RA, FonziWA. Virulence factors of *Candida albicans* Trends in Microbiol.2001;9:327-335.
5. Bektic J.; Lell CP, Fuchs A.; Stoiber H.; Speth C , Lass-Flörl C; Borg-Von Zepelin M.. Factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiol. 2001; 9: 327-335.
6. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol.Rev. 2003,67;400-428.
7. Andrade, G M.; Felipe, I. Evidence for the participation of proteinases released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages *in vitro*. Braz. J. Med. Res.1992; 25:167-174.
8. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia 1982, 20: 233-244.
9. Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinases secreted by candida species. Mycoses, 1996; 39:161-167.
10. Dos Santos AA, De sá EAC, Gaziri LCJ, Felipe I. Treatment of serum with supernatant from cultures of *Candida albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. Braz. J. Microbiol.2002; 33:79-83.
11. Panagio LA, Felipe I, Vidotto M.C., Gaziri LCJ. Early membrane exposure of phosphatidyl serine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from HIV-infected individual. J. Med Microbiol.2002;51: 929-936.

12. Gasparoto TH, Gaziri LCJ, Burger E, De Almeida RSC, Felipe I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. FEMS Immun. Med. Microbiol.2004;42:219-224.
13. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Taconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In Vitro and n vivo anticadidal activity of human immunodeficiency vírus protease inhibitors. J.Infec. Dis. 1999;180:448-453.
14. Gruber A., Vogl E L, Borg-von Zepelin, M., Dierich M P, Würzner R. Humy virus type gp160 and gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances *Candidal* virulence *in vitro*. J. Inf. Dis. 1998;177:1057-1063.
15. Arribas JR, Hernandez- Albuja S, Gozales- Garcia JJ, Et al. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. AIDS 2000;14:979-985.
16. Ollert MW, Wende C, Görlich M, Vogel CGM, Borg-von Zepelin M., Vogel C W, Korting H.C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.** 1995; 33: 2543-2549.
17. De Bernardis F, Modello F, Scaravelli et al. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency infected -virus women J. Clin. Microbiol. 1999;37:1376-1380.
18. Vargas K; Messer SA, Pfaller M, Lochart. R, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. J. Clin. Microbiol.,2000 ;38: 3595-3607.
19. Gruber A, Berlit J, Speth C, et al. Dissimilar attenuation of candida albicans virulence properties by human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. Immunobiol. 1999;201:133-144.
20. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Köhler G, Michel S, Hof H, Hacker J, Morschhäuser J Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. Molec. Microbiol.1999; 32: 533-546.

21. Hube H. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev. Iberoam. Mycol.* 1998;15: 65-68.
22. Schaller M, Korting H.C, Schafer W, Bastert J, Chen W, HUBE B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Molec. Microbiol.*1999; 34: 169-180.
23. Monod M, Hube B, Hess D, Saglard D. Differential regulation of Sap 8 and sap9 , wich encode two new members of the secreted aspartic proteinase famly in *Candida albicans*. *Microbiol.* 1998; 144: 2731-2737.
24. Koesch G, Tang J, Loy JA, Monod M, Jackson K, Foundlinh SI, Lin X. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans* *Bioch.Bioph. Acta* 2000; 1480:117-131
25. Chen YC, Wu CC, ChungWL, LeeFJS. Differential secretion of Sap4-6 proteins in *candida albicans* during hyphae formation *Microbiol.* 2002; 148: 3743-3754.