

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CEPAS CLÍNICAS DE *Candida* spp.

Carolina Borges Cordeiro<sup>1</sup>, Alice Marques Moreira Lima<sup>2</sup>, Isabella Romeiro de Paula Sena<sup>3</sup>,  
Angelica Rodrigues Pereira Braga<sup>4</sup>, Marcelo Souza de Andrade<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestra em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão.

<sup>2</sup>Mestra em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão.

<sup>3</sup> Mestranda em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís,  
Maranhão.

<sup>4</sup> Mestra em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão.

<sup>5</sup> Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão.

DOI: 10.47094/ICOLUBRAIS.2021/64

**PALAVRAS-CHAVE:** Candidemias. Patogenicidade. Exoenzimas.

**ÁREA TEMÁTICA:** Outras

### INTRODUÇÃO

A incidência de infecções invasivas fúngicas vem sendo descritas de forma crescente nos últimos anos sendo as cepas leveduriformes do gênero *Candida* spp responsáveis de forma prevalente por essas infecções. Estas leveduras que normalmente habitam de forma comensal na microbiota tanto seres humanos quanto de animais saudáveis, em determinadas circunstâncias, podem expressar fatores de virulência como a produção de enzimas, o que lhes confere caráter patogênico, logo, resistência a tratamentos convencionais.

A principal patologia ligada às leveduras é representada pelas candidemias que normalmente ocorrem quando o sistema imunológico do indivíduo se torna comprometido, sob condições clínicas debilitantes, procedimentos cirúrgicos, pessoas acometidas com síndromes metabólicas (obesidade, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2), portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), entre outros fatores (ZUZA-ALVES *et al*, 2017).

O presente estudo teve como objetivo investigar a produção de enzimas como fator de virulência das amostras clínicas das espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida orthopsilosis* dispostas na coleção de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão – LABMICO/NIBA/UFMA.

Logo, foi realizada uma pesquisa de abordagem experimental e descritiva com a indução *in vitro* de produção de enzimas por parte das cepas clínicas disponíveis para o estudo. As enzimas comumente produzidas pelo gênero *Candida* spp foram as mesmas utilizadas nesse estudo: lipase, amilase, proteinase e fosfolipase.

Após conclusão dos testes foi possível constatar que as amostras dispostas no banco de dados eram capazes de produção enzimática como um fator de virulência em cepas clínicas.

## **METODOLOGIA**

### **Tipo de estudo**

Foi utilizada a abordagem experimental e descritiva para alcance dos objetivos propostos na investigação. Essa pesquisa obteve aprovação CEP/Plataforma Brasil de Nº 30994120.1.0000.5087.

### **Tipo de amostras**

Os ensaios foram realizados com 12 cepas oriundas de amostras clínicas (urina, secreção vaginal, secreção traqueal, lavado brônquico, unha, fezes, sangue e pele) que fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão – LABMICO/NIBA/UFMA, em São Luís, Maranhão.

### **Identificação molecular**

Para confirmação da identificação morfológica foi realizado o ensaio molecular, com utilização de protocolo de extração bioquímico de acordo com metodologia de Valenzuela-Lopez *et al.* (2017) e adaptações, reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers espécie-específicos, amplificação da região do espaçador transcrito interno (ITS) e eletroforese. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador PCR 2720 Applied Biosystems.

### **Testes enzimáticos**

#### **Lipase e amilase**

Para avaliar a expressão dessas enzimas foram utilizadas as metodologias de peptona bacteriológica e amido de milho de Hankin & Anagnostakis (1975) respectivamente. Para determinação de reação positiva foi necessário a visualização da formação de cristais de sal de cálcio ou formação de zonas claras em volta do inóculo em razão da completa degradação do sal de ácido gorduroso. As zonas que precipitaram foram reveladas com a utilização de lugol e cristal violeta. Para determinar o índice enzimático (IE) foi utilizada a seguinte fórmula dos mesmos autores: diâmetro do halo/diâmetro da colônia. A interpretação de dados é feita de forma diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o valor de IE, maior será a atividade enzimática.

#### **Proteinase e fosfolipase**

Para esses testes foi utilizada a metodologia de Price *et al* (1928) do leite desnatado e da gema de ovo, respectivamente. A reação positiva foi visualizada com a formação de halo translúcido, não sendo necessária a adição de solução reveladora na superfície do meio. A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de um halo opaco ao redor da colônia (precipitação de complexos de

cálcio). O valor da zona de precipitação (Pz) foi dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia). A produção das enzimas foi classificada de acordo com Price *et al.* (1982) de acordo com os valores dispostos na tabela:

Tabela 1 - Interpretação dos resultados dos testes para determinação da atividade de proteinase e fosfolipase.

Zona de precipitação (Pz)	Resultado
≤0,69	Muito forte ++++
0,70-0,79	Forte +++
0,80-0,89	Média ++
0,90-0,99	Fraca +

Fonte: Adaptado de BRANCO *et al.*, 2012; MANE *et al.*, 2012.

As amostras passaram por um processo de diluição em solução salina (NaCl 0,85% e água destilada) seguindo a escala 3 de *Mc Farland*. Em todos os testes enzimáticos foi realizado o inóculo em triplicata das amostras diluídas.

### Análise estatística

Os resultados enzimáticos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos dados foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Bioestat 5.3 seguindo metodologia de Ayres *et al.* (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios positivos para produção de lipase e amilase foram revelados através da utilização de lugol e cristal violeta 0,4 %, respectivamente. Nos meios de proteinase e fosfolipase não houve a necessidade da utilização de solução reveladora porque após as 48 horas foi possível visualizar tanto os precipitados salinos quanto os halos translúcidos. As amostras que obtiveram resultado positivo tiveram seus halos medidos e os cálculos da zona de precipitação (Pz) e índice enzimático (IE) foram realizados.

Para a atividade de lipase foi constatado que todas as cepas foram produtoras dessa enzima, totalizando 100% de produção. O maior valor de IE encontrado para esse teste foi para *C. tropicalis* (urina) com 0,80. Apesar de ter sido enzima mais produzida, não houve diferença estatística significativa entre as espécies ( $p=0,8050$ ).

Em pesquisa realizada por Jasim *et al.*, (2016) envolvendo produção de lipase por *Candida* spp utilizando a mesma metodologia desse estudo foi constatado que a maior espécie produtora dessa enzima foi *C. albicans* totalizando 64% das amostras enquanto espécies *não-albicans* totalizaram apenas 36,6%.

A produção de amilase foi visualizada em todas as cepas de *C. albicans* e em *C. parapsilosis* (fezes) totalizando 41,6% da produção enzimática. O maior valor encontrado foi para a cepa de *C. albicans* secreção vaginal (0,80). Na análise estatística foi demonstrado que houve diferença

significativa na produção enzimática entre os sítios ( $p = 0,0002$ ). Após revisão de literatura foi constatado que existem poucos trabalhos publicados a respeito da produção de amilase como fator de virulência principalmente para o gênero *Candida* spp.

Outro estudo realizado por Alencar *et al* (2012) envolvendo testes enzimáticos com dois gêneros de leveduras (*Candida* spp e *Cryptococcus* spp), constatou que não houve liberação de enzimas para degradar os substratos de amido. A maioria dos estudos recentes com produção de enzimas como fator de virulência não utiliza amilase como critério. Os achados durante revisão de literatura demonstraram, na verdade, que outras espécies não patogênicas do gênero *Candida* spp produzem amilase como um potencial redutor da produção de biofilme.

Para proteinase apenas as cepas de *C. albicans* foram produtoras da enzima totalizando 33,3 % das amostras. Com relação ao valor de Pz todas as cepas apresentaram valor  $\leq 0,69$  que é classificado como muito forte. Não houve diferença significativa da produção dessa enzima entre as cepas de *C. albicans* pois  $p = 0,5713$ . Rocha *et al* (2017) em um estudo envolvendo produção enzimática por cepas clínicas de *C. tropicalis* encontrou um resultado de 42,9% para produção de proteinase em que o Pz apresentou valor entre 0,56-0,86.

Para fosfolipase, 25% das amostras foram positivas. Na espécie *C. albicans* não houve produção enzimática pelas cepas de secreção traqueal e vaginal. Estatisticamente, não houve diferença significativa na produção enzimática ( $p=0,2700$ ). Nenhuma cepa das espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis* apresentou formação dessa enzima. Branco *et al* (2012) em sua pesquisa constatou que houve produção de fosfolipase em 52% de suas amostras. Todas as espécies utilizadas em seu estudo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* produziram essa enzima tendo prevalência em *C. albicans* que produziu 93,1%.

## CONCLUSÃO

Os meios de cultura utilizados para os testes enzimáticos desse estudo obtiveram resultado satisfatório. As cepas clínicas do gênero *Candida* spp. apresentaram a produção de exoenzimas hidrolíticas como fator de virulência. A maior atividade enzimática foi encontrada em lipase e a menor em amilase. A espécie com maior produção enzimática foi *C. albicans* sendo a amostra de urina a mais positiva para todos os meios enzimáticos.

## REFERÊNCIAS

PRICE M.F., WILKINSON I.D., GENTRY I. O. **Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans***, Sabouraudia, v.20, p.15-20, 1982. DOI: 10.1080 / 00362178285380031. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7038928/>. Acesso em: 10 Mar 2021.

ROCHA et al. **Virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis***. Rev. Investig, Bioméd. São Luís, v. 9, n.2, p. 118-128, 2017.

VALENZUELA-LOPEZN, et al. **Coelomycetous fungi in the clinical setting: morphological**

**convergence and cryptic diversity.** J Clin Microbiol., v. 55, p. 552-567, 2017. DOI: 10.1128 / JCM.02221-16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27927918/>. Acesso em: 15 Mar 2021.

ZUZA-ALVES D L, SILVA-ROCHA WP AND CHAVES GM. **An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches.** Front. Microbiol., v.8, n. 1927, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01927. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01927/full>. Acesso em: 30 Abr 2021.