

## Tubos germinativos na genotipagem de isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis

*Germ tubes in the genotyping of Candida albicans oral isolates from children with Down's Syndrome and their parents and/or guardians*

Evandro Leão Ribeiro<sup>1</sup>

Mara Sílvia Carvalhaes<sup>1</sup>

Cerise de Castro Campos<sup>1</sup>

Cleber Gomes Cardoso<sup>1</sup>

Orlando Ayrton de Toledo<sup>2</sup>

Fabiana Cristina Pimenta<sup>1</sup>

Correspondência: evandroo@terra.com.br

### RESUMO

A expressividade de tubos germinativos por *Candida albicans* favorece a capacidade de virulência fúngica. Nove pares de isolados bucais de *C. albicans* de crianças com Síndrome de Down (CCSD) e pais e/ou responsáveis (P e/ou R) foram analisados quanto à formação de tubos germinativos (TG) e com genotipagem, variando de 45 a 100%, entre os pares de *C. albicans* conjugados, mediante o uso de RAPD e emprego dos primers RSD 10 e 12. Cinco pares de *C. albicans* (55,5%) de CCSD formaram TG em 1h e os demais em 2h. Todos os isolados de leveduras da cavidade bucal de P e/ou R formaram TG dentro de 2h com diferença estatisticamente significativa favorável às CCSD. A formação de tubos germinativos entre isolados bucais de *C. albicans* de CCSD e P e/ou R pareceu sofrer influência da variabilidade genética apresentada pelas cepas desse fungo e pelo condicionamento da situação microbiológica demonstrada pela cavidade bucal desses indivíduos em análise.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndrome de Down. *Candida albicans*. Tubos germinativos. Genotipagem.

### ABSTRACT

The expressiveness of germ tubes for *Candida albicans* favors the fungal virulence. Nine pairs of oral isolates of *C. albicans* in children with Down's Syndrome (CwDS) and their parents and/or guardians (P and/or G) were analyzed with regard to the formation of germ tubes (GT) and with genotyping, varying from 45 to 100% among conjugated pairs of *C. albicans* oral isolates, by the use of RAPD and employment of the primers RSD 10 and 12. Five pairs (55.5%) of *C. albicans* of CwDS formed GT in 1h and the other ones in 2h. The yeast isolates of the buccal cavity of P and/or G formed GT within 2h with favorable and significantly statistical difference to CwDS. The formation of GT among *C. albicans* of CwDS and their P and/or G seemed to suffer influence of the genetic variability presented by the strains of this fungus and for the conditioning of the microbiological situation demonstrated for the buccal cavity of these individuals in analysis.

**KEY WORDS:** Down's Syndrome. *Candida albicans*. Germ tubes. Genotyping.

---

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Faculdade de Odontologia e Campus Avançado de Jataí da Universidade Federal de Goiás.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília/DF.

## INTRODUÇÃO

A capacidade de formação de tubos germinativos por *Candida albicans* tem sido relacionada com o aumento da virulência fúngica [1-4]. Essa habilidade favorece uma correlação entre a capacidade de aderência de *C. albicans* e o isolamento de leveduras proveniente de tecido parasitado uma vez que a espécie *albicans* forma tubos germinativos mais precocemente que as demais espécies de *Candida* [2,5]. Vários fatores regulam a transição de células leveduriformes para tubos germinativos e, posteriormente, a pseudo-hifas e micélios. Esses fatores compreendem temperatura, pH e meios que contenham substâncias indutoras (soro, N-acetil-D-glicosamina, L-prolina, etanol) e presença de agentes quelantes que inativam a disulfidril redutase, enzima responsável pela redução das pontes dissulfeto da parede celular. O crescimento miceliano, decorrente da formação de tubos germinativos, é observado como uma repressão da divisão normal da célula leveduriforme, em que as ligações covalentes de dissulfeto da parede celular não sofrem redução enzimática. Essa capacidade fúngica é acompanhada por alterações na composição química e antigênica da célula de *C. albicans*. Na fase filamentosa, a parede celular é composta por 3 vezes mais quantidade de quitina e a concentração protéica parece aumentar. A fase leveduriforme pode ser considerada como uma forma mais virulenta, apresentando grande quantidade de mananas na parede celular e pequenas quantidades de glucanas, em relação à forma filamentosa. Esses complexos de mananas da parede celular atuam como toxinas em camundongos e, portanto, devem contribuir para uma maior virulência [2,5-7]. *In vitro* tem-se demonstrado que temperatura que oscila entre 37 a 40°C, pH entre 6,5 a 7,0; assim como a presença de uma concentração inicial de leveduras que não exceda a 10<sup>6</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônias/mililitro), é essencial às detecções de tubos germinativos. As leveduras do gênero *Candida* quando submetidas a pH 2,6 também mantêm essa capacidade fúngica de virulência [6,27]. Melo et al. [8] admitiram que 2 genes metabólicos CaHT17 (alta afinidade pelo transporte de hexose) e CaYLL34 (membro da família AAA ATPase) estariam relacionados com esse dimorfismo de *C. albicans*, tendo em vista o aumento da expressividade protéica dos genes na condição de hifa.

O contato imediato de leveduras do gênero *Candida* com a mucosa bucal dos recém-nascidos faz desse fungo um micro-organismo extremamente relevante, não só na compreensão do mecanismo de transmissão fúngica materno-infantil, mas também na postura comportamental que o mecanismo de defesa orgânica da criança assume, através do desenvolvimento do sistema imunológico e como este se porta diante de indivíduos acometidos de alteração cromossômica como a Síndrome de Down [9-15].

O elevado índice de isolamento e identificação de *C. albicans* da microbiota bucal de crianças com Síndrome de Down (CCSD) torna necessária a avaliação da capacidade de virulência dessas amostras fúngicas uma vez que a passagem das leveduras da condição sapróbia para patógena é frequente pelos constantes relatos de candidose bucal em CCSD [15,16].

Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de formação de tubos germinativos diante da genotipagem de isolados bucais de *C. albicans* de CCSD e dos respectivos pais e/ou responsáveis (P e/ou R).

## MATERIAL E MÉTODO

**Amostragem.** Nove (9/40) (22,5%) pares de *C. albicans* concomitantemente isoladas da mucosa bucal, mediante emprego de swab, de CCSD e P e/ou R, com análise intraespecífica entre isolados de *Candida* por emprego de RAPD (DNA polimórfico de amplificação randomizada) [17] com primers RSD 10 5'-CCGCAGCCA-3' e RSD 12 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3' [18] e o dendograma com homologia genética entre pares de leveduras analisados variando de 45 a 100% foram empregados neste estudo. Todas CCSD e os P e/ou R, dos quais foram isoladas amostras bucais de *C. albicans*, possuíam uma faixa etária de zero a 11 anos e de 30 a 55 anos de idade respectivamente. Esses indivíduos apresentavam ainda 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 (CO/FO/UFG) em Goiânia-GO, Brasil. As amostras de *C. albicans* foram isoladas e identificadas segundo Kreegen van-RIJ [19]. Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEPMHA/HC/UFG), e os pais e/ou responsáveis pelas crianças forneceram consentimento escrito aos pesquisadores.

**Tubotipagem.** Foi realizada mediante a obtenção de suspensão de 1 mL, em água destilada e autoclavada, de células de *Candida* de cada amostra analisada, cultivada em ágar Sabouraud dextrose por 24 a 48h, contendo, aproximadamente, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, após leitura em câmara de Neubauer. Posteriormente, cada amostra de *Candida* foi homogeneizada a baixa rotação, inoculada em tubo de ensaio de 13x60 mm, contendo 0,5 mL de soro fetal bovino, e mantido em banho-maria a 37°C por 4h. Durante esse período, a cada intervalo de 1h, de cada suspensão dessas amostras, 1 gota foi examinada ao microscópio (objetiva de 40X) entre a lâmina e lamínula. A evidenciação do tubo germinativo configurava teste positivo [2,20].

**Estatística.** Foi utilizado o teste de Fischer (F) para correlacionar o número de amostras de *C. albicans* isoladas dos grupos de CCSD e P e/ou R que induziram a formação de tubos germinativos dentro de 1 a 2h. Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dos 9 pares de amostras bucais de *C. albicans* simultaneamente isoladas de CCSD e P e/ou R com alteração cromossômica e com genotipagem variando de 45 a 95%, 4/5 (80%) (08-08RF, 14-14RF, 19-19RF e 27-27R) induziram a formação de tubos germinativos dentro de 1h entre crianças. Dois pares (2/9) (22,2%) (16-16RF e 37-37RF) de *C. albicans*, isoladas concomitantemente da cavidade bucal de CCSD e P e/ou R e com homologia idêntica, propiciaram em uma das amostras do par 37-37RF a formação de tubo germinativo dentro de 1h e outro (16-16RF) em 2h entre as crianças cromossomopáticas. Todas as amostras de *C. albicans* oriundas da cavidade bucal de P e/ou R formaram tubos germinativos em 2h com similaridade genética oscilando de 45 a 100%. Significância estatística foi presenciada entre o número de amostras bucais de *C. albicans* de CCSD e P e/ou R que formaram tubos germinativos dentro de 1 a 2h (Tabela 1).

Tabela 1-Formação de tubos germinativos por *C. albicans* oriundas simultaneamente da cavidade bucal de CCSD e P e/ou R com percentual de homologia entre os pares conjugados de leveduras analisados por RAPD com os primers RSD 10 e 12

Pares conjugados de <i>C. albicans</i> bucais de CCSD e P e/ou R (n = 09)	Formação de tubos germinativos em SFB a 37°C				Homologia entre os pares conjugados de <i>C. albicans</i> bucais de CCSD e P e/ou R por RAPD com os primers RSD 10 e 12 (%)
	CCSD		P e/ou R		
	1h (n = 05)	2h (n = 04)	1h (n = 00)	2h (n = 09)	
04-04RF	-	01	-	01	45
08-08RF	01	-	-	01	95
14-14RF	01	-	-	01	45
16-16RF	-	01	-	01	100
19-19RF	01	-	-	01	45
22-22RF	-	01	-	01	95
27-27RF	01	-	-	01	45
33-33RF	-	01	-	01	45
37-37RF	01	-	-	01	100

CCSD – crianças com Síndrome de Down

Teste de Fisher (F = 6,92;  $p < 0,05$ )

P e/ou R – Pais e/ou responsáveis de CCSD

Média de homologia genética entre as *C. albicans* bucais de CCSD e P e/ou R = 68,3%

RF – Relação intrafamiliar (CCSD e P e/ou R)

SFB – soro fetal bovino; n – número; h – horas;

## DISCUSSÃO

*Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais relacionada com os processos de colonização e patogenicidade na cavidade bucal do homem. Essa habilidade é decorrente da acentuada capacidade de dimorfismo com indução de formação de tubos germinativos e a secreção de exoenzimas (aspartil proteinases e fosfolipases), facilitadoras da interação do fungo às células do hospedeiro, propiciando a aderência e a penetração ao tecido afetado, etapas consideradas relevantes na patogênese de candidose em mucosa [3,13,21-24].

As CCSD caracterizam-se por apresentar a mucosa da boca altamente colonizada de micro-organismos, principalmente por *C. albicans* [3,9,15,16]. A ampla expressividade fenotípica apresentada por essa levedura na mudança da microbiota bucal entre CCSD e P e/ou R, com similaridade genética de 45 a 100% e formação de tubos germinativos mais precocemente entre os isolados bucais de *Candida* de CCSD (Tabela1), demonstrou o amplo recurso genotípico apresentado por esse fungo e a influência que o meio bucal pode propiciar [9,14-16,22,25]. Aspecto evidenciado basicamente entre os pares conjugados de isolados bucais de *C. albicans* idênticos geneticamente (16-16RF e 37-37RF) de CCSD e P e/ou R que induziram a formação de tubos germinativos dentro de 1 e 2h conforme a amostra de levedura dos pares considerados (Tabela1). Roncari et al. [14] relataram o isolamento de leveduras de *Candida* em 69% das CCSD analisadas e em 40% dos casos apresentaram vinculação com candidose bucal pseudomembranosa e Pardi e Cardoso [25] sugeriram o dorso da língua como o reservatório primário de *C. albicans* na boca, seguido pela agregação fúngica ao biofilme dentário. Essa levedura ainda apresenta a capacidade de suportar um amplo espectro de variação de pH entre 2,5 a 7,5 com detecção em alterações acidúricas bucais induzidas por carboidratos com a ocorrência conjuntamente de estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos e alcalinas em processos inflamatórios bacterianos induzidos por *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* sp e *Fusobacterium* sp [26] e tem a patogenicidade favorecida pela

temperatura corporal de 37°C. Tais características de *C. albicans* demonstraram a ampla variabilidade genética que as cepas podem apresentar em mucosa, como a da boca [4,5,25,27].

A formação de tubos germinativos por isolados bucais de *C. albicans* é visto como um fator preponderante à sobrevivência do fungo [9,12,22,25]. Essa característica, embora presenciada mais facilmente *in vitro*, é detectada em leveduras oriundas da cavidade bucal íntegra e principalmente acometida de infecção [2,5]. Souza et al. [7], utilizando como substrato o soro fetal bovino, observaram que com uma 1h de incubação a 37°C, 86,6% das amostras de *C. albicans*, oriundas de inúmeros materiais clínicos, haviam formado tubos germinativos; com 2h, 96,6% dos isolados induziram a formação dessa estrutura e com 3h de incubação, todas as leveduras de *C. albicans* haviam formados tubos germinativos. Steffan et al. [28] detectaram de 98% das espécies de *Candida* determinadas por RAPD com *primer* interespecífico, a capacidade de 30% das *C. albicans* identificadas apresentarem a capacidade de formar tubos germinativos em 2h. Pinto [6], em indivíduos HIV hospitalizados, e López et al. [20], em pacientes com candidose bucal, evidenciaram também a capacidade de isolados de *C. albicans* induzirem a formação de tubos germinativos em 2h e Rocha et al. [29], identificando e diferenciando 34 isolados de *Candida* de crianças hospitalizadas por RADP fazendo uso do *primer* OPG-10, presenciaram em 24 (70,6%) amostras de *C. albicans* a ocorrência de tubos germinativos no intervalo de tempo de 1 a 2h.

## CONCLUSÃO

A ampla capacidade das cepas de *C. albicans* induzirem a formação de tubos germinativos, mesmo na presença da microbiota da boca de crianças com alteração cromossômica e diante de uma expressiva variabilidade genética dos isolados leveduriformes bucais provenientes concomitantemente de CCSD e P e/ou R, as tornam mais suscetíveis à colonização fúngica e, conseqüentemente, a processos infecciosos na cavidade bucal destes pacientes por *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS

1. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *C. albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *J Infect Immun.* 1980; 28: 464-8.
2. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia médica.* São Paulo: Sarvier; 1991.
3. Ribeiro EL, Scroferneker ML, Carvalhaes MS, Campos CC, et al. Phenotypic aspects of oral strains of *C. albicans* in children with Down's syndrome. *Braz J Biol.* 2006; 66: 939-44.
4. Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, et al. Differences in extracellular enzymatic activity between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. *Rev Iberoamer Micol.* 2002; 21: 70-4.
5. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
6. Pinto MP. *Caracterização fenotípica e análise da variabilidade de genética de espécies do gênero Candida isoladas de pacientes portadores e não portadores de doença de base.* [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2003.
7. Souza BEM, Paula CR, Purchio A, Gambale W. et al. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C. albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol.* 1990; 21: 247-53.
8. Melo ASA, Serafim CR, Briones MRS. Identification of genes differentially expressed in hiphae of *C. albicans*. *Braz J Microbiol.* 2003; 34: 135-7.
9. Coelho CRZ, Loevy HT. Aspectos odontológicos da Síndrome de Down. *ARS Curandi Odont.* 1982; 8(3): 9-16.
10. Holmes DK, Bates N, Murray M, Laudusans EJ et al. Hematopietic progenitor cell deficiency in fetuses and children affected by Down's syndrome. *Experim Hematol.* 2006; 34: 1611-5.
11. Jacobs PF, Burdash NM, Manos JP, Duncan, RC. Immunologic parameters in Down's syndrome. *Ann Clin & Lab Sci.* 1978; 8: 17-22.
12. Kallaur AP, Buqui, GA, Sabino GC, Mastellari RB, et al. Frequência das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário Londrina/PR. *Semina Cienc Biol Saúde.* 2007; 28(1): 23-32.
13. Menezes EA, Guerra ACP, Rodrigues RCB, Peixoto MML, et al. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. *J Bras Patol Med Labor.* 2004; 40: 299-305.
14. Roncari AM, Rodrigues AB, Elias MS. Síndrome de Down. *Investigação.* 2002; 6: 70-4.
15. Rozone G, Mustacchi Z. *Síndrome de Down: aspectos clínicos e odontológicos.* São Paulo: CID; 1990.
16. Carlstedt K, Krekmanova L, Dahllof G, Ericsson B, et al. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. *Inter J Pediatr Dent.* 1996; 6: 95-100.
17. Casali AK, Goulart L, Silva LKR, Ribeiro AM, et al. Molecular typing of clinical and environmental *C. neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research.* 2003; 3(4): 405-15.

18. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, Yan JYY, et al. Genotypic shuffling of sequential clones of *C. albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 349-59.
19. Kreeger-van RIJ. *The yeast: a taxonomic study.* Amsterdam: Elsevier; 1984.
20. Lopez C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, et al. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Arg Microbiol.* 2005; 37: 16-21.
21. Martins CAP, Santos SSF, Loberto JS, Koga-Ito CY, et al. Presença *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. *Cienc Odontol Brasil.* 2002; 5: 75-85.
22. Panizo MM, Reviakina V. *C. albicans* y su efeito patógeno sobre las mucosas. *Rev de la Soc Venez de Microbiol.* 2001; 21: 15-31.
23. Ribeiro EL, Campos CC, Crespo AMC, Castro JS, et al. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com Síndrome de Down. *Acta Med Port.* 2002;14:33-42.
24. Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, et al. Specific and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3835-943.
25. Pardi G, Cardoso EI. Algumas consideraciones sobre *C. albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez [serial online]* 2002; 40. Disponível em: URL: <http://www.actaodontologica.com>
26. Simmonds RS, Tompkins GR, George RJ. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: review of recent advances. *N Z Dent J.* 2002; 96: 44-9.
27. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harry DWS, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Austral Dental J.* 1998; 43: 45-50.
28. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, et al. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2031-2039.
29. Rocha BA, Del Negro GMB, Yamamoto L, Souza MVB, et al. Identification and differentiation of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41: 1-5.