

Comportamento dos isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis às toxinas killer

Behavior of Candida albicans oral isolates from children with Down's syndrome and their parents and/or guardians to killer toxins

Evandro Leão Ribeiro¹
Clever Gomes Cardoso¹
Cerise de Castro Campos¹
Mara Sílvia Carvalhaes¹
Orlando Ayrton de Toledo²
Fabiana Cristina Pimenta³

Correspondência: evandroo@terra.com.br

RESUMO

A biotipagem killer é um marcador epidemiológico empregado para a diferenciação dos isolados de leveduras dentro da mesma espécie. Maior diversidade de killer-tipos foi presenciada entre as amostras de leveduras do gênero *Candida albicans* oriundas da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down em comparação aos killer-tipos detectados nas demais leveduras bucais do gênero *Candida* procedentes de crianças desprovidas de síndrome e pais e/ou responsáveis pelas crianças com alteração cromossômica. O emprego da biotipagem killer possibilitou assim o mapeamento comportamental epidemiológico das leveduras do gênero *Candida albicans* envolvidas no processo de colonização da boca de crianças síndrômicas ou não e os pais e/ou responsáveis de crianças cromossomopáticas.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome de Down, *Candida albicans*, Toxinas killer, Killer-tipos.

ABSTRACT

The killer biotyping is an epidemiological marker used for the differentiation of yeast isolates within the same species. Greater diversity of killer-types was witnessed among the strains of the genus *Candida albicans* from the oral cavity of children with Down syndrome compared with killer-types found in other oral yeasts of the genus *Candida* coming of children without syndrome and their parents and/or guardians of children with chromosomal alteration. The use of killer biotyping possible so behavioral epidemiological mapping of the yeasts *Candida albicans* involved in the colonization of the mouth of children syndromic or non-syndromic and parents and/or guardians of children chromosomotype.

KEY WORDS: Down's Syndrome, *Candida albicans*, toxins, Killer-types.

1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Faculdade de Odontologia e Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO

2 Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília/DF

3 Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta/USA

INTRODUÇÃO

O efeito *killer* é um marcador fenotípico, empregado há quatro décadas, para tipificar leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* e *Trichosporon* [1]. Esse efeito baseia-se na suscetibilidade dos isolados de fungos leveduriformes aos efeitos tóxicos de nove diferentes leveduras *killer* pertencentes ao gênero *Pichia* e *Hansenula*. Quanto às características bioquímicas, essas toxinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, sensíveis às enzimas proteolíticas, alterações de temperaturas e pH. Seu mecanismo de ação caracteriza-se por induzir a formação de poros na membrana citoplasmática, acarretando uma alteração da permeabilidade com a saída de íons potássio para o meio, inibição do transporte ativo de aminoácidos, acompanhado de acidificação do interior celular, o que resulta em lise celular [2-6].

No campo de atuação biomédico, as toxinas *killer* produzidas pelas leveduras podem ainda atuar como fontes indutoras de propriedades antimicóticas, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação em dermatofitoses crônicas e severas [7].

A boa reprodutibilidade do sistema *killer* na tipificação de leveduras fez com que Morace et al.[8] sugerissem o emprego desse método de fenotipagem para uma melhor compreensão da epidemiologia das leveduras quanto à variabilidade de isolados envolvidos na colonização de um sítio anatômico e/ou no estabelecimento de uma infecção por fungo, inclusive *Candida*.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com e sem Síndrome de Down (CCSD) (CSSD) e pais e/ou responsáveis (P e/ou R) pelas crianças com irregularidade cromossômica frente às toxinas *killer*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Sessenta isolados bucais de *C. albicans* foram empregados neste estudo. Dos quais 37/40 (92,5%) foram provenientes da mucosa jugal de CCSD, 14/80 (17,5%) de CSSD e 09/40 (22,5%) de P e/ou R. Todas as amostras de *Candida* foram coletadas, em duplicata, com swabs esterilizados de pacientes atendidos na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) na cidade de Goiânia-GO/Brasil e identificadas segundo Kreegen van RIJ [9]. Esses indivíduos apresentavam mucosa bucal íntegra, não faziam uso de nenhuma medicação e possuíam uma faixa etária de zero a 11 anos de idade para as crianças e de 30 a 55 anos para P e/ou R. O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e os pais e/ou responsáveis pelas crianças forneceram consentimento aos pesquisadores.

Toxinas *killer*

O fenômeno foi verificado segundo Polonelli et al [10,11]. Os isolados em estudo foram cultivados por 24 horas em ágar Sabouraud modificado (peptona-10g, dextrose-20g, ácido cítrico-19,2g, fosfato de potássio bibásico-34,8g, ágar-20,0g e água destilada qsp para 1000mL ajustado a pH 4,5). Um (1) mL de suspensão de *C. albicans* correspondente a escala 3 de McFarland foi vertida em placas de Petri esterilizadas e, em seguida, adicionadas em meio de ágar Sabouraud modificado acrescido de azul de metileno (30mg).

Após a solidificação da suspensão e meio de cultura fez-se o inóculo na superfície do meio em pontos equidistantes das toxinas padrão K1 a K9, correspondendo respectivamente à *Hansenula sp* (Stumm-1034), *Pichia sp* (Stumm-1035), *Hansenula anomala* (Um-Milano), *Hansenula anomala* (CBS-5759), *Hansenula anomala* (Ahearn UN866), *Hansenula californica* (Ahearn-WC40), *Hansenula canadensis* (Ahearn-WC41), *Hansenula dimennae* (Ahearn-WC44), *Hansenula mrakii* (Ahearn-WC51).

A leitura foi realizada 72 horas após incubação a 25°C e foram considerados sensíveis (+), os cultivos que apresentaram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis ao redor dos isolados "padrão", e como resistentes os cultivos que apresentaram crescimento ao redor das cepas "padrão".

Os resultados de sensibilidade às toxinas *killer* foram designados pelo esquema proposto por Polonelli et al [10,11], composto por 3 dígitos, sendo que cada um representa a combinação dos resultados obtidos pelo conjunto de 3 cepas padrão de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Código de leitura aplicado ao sistema *killer*. Polonelli et al. (1983)

Atividade do 1 ^o "triplet" de leveduras			Atividade do 2 ^o "triplet" de leveduras				Atividade do 3 ^o "triplet" de leveduras				
K ₁	K ₂	K ₃	Código	K ₄	K ₅	K ₆	Código	K ₇	K ₈	K ₉	Código
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

Legenda: - levedura sem halo claro ao redor das leveduras-padrão *killer*
 + levedura com halo claro ao redor das leveduras-padrão *killer*

RESULTADOS

A biotipagem das *C. albicans* da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R, frente às leveduras produtoras de toxinas *killer*, permitiu a detecção de cinco *killer*-tipos. Maior diversidade destes *killer*-tipos foi verificada no grupo de CCSD. O *killer*-tipo 111 predominou nos três grupos em estudo (Tabela 2).

Tabela 2. *Killer*-tipos de *C. albicans* da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

<i>C. albicans</i> <i>Killer</i> -tipos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
111	17	46,0	11	78,6	05	55,6
112	14	37,8	03	21,4	03	33,3
121	03	8,1	-	-	01	11,1
186	02	5,4	-	-	-	-
888	01	2,7	-	-	-	-

Legenda: n – número
 % – por cento

DISCUSSÃO

Biodiversidade de cinco *killer*-tipos (111, 112, 121, 186 e 888) de sensibilidade a toxinas *killer* foi constatada em todas *C. albicans* tipificadas com predomínio do *killer*-tipo 111, independentemente dos grupos de estudo avaliados neste trabalho. Os isolados de *C. albicans* da boca de CCSD apresentaram maior diversidade de *killer*-tipos, sendo que os demais (111, 112) e (111, 112 e 121) foram identificados nas leveduras do gênero de *Candida* pertencentes aos grupos controle (CSSD) e P e/ou R, respectivamente, e encontravam-se incluídos dentro do elenco dos cinco *killer*-tipos presenciados no grupo teste (CCSD) (Tabela 2).

A análise de colônias de *C. albicans* da boca de gestantes, indivíduos adultos com boca íntegra, com bolsa periodontal e os com periodontite crônica caracterizou o *killer*-tipo 111 como significativa [4,6,12,13]. Polonelli et al [10] identificaram 25 *killer*-tipos diferentes numa população de 100 amostras de diversas leveduras com a prevalência do *killer*-tipo 111 em 52,0% dos fungos analisados.

O *killer*-tipo 888 (leveduras não tipificáveis), ou seja, resistentes a todas as proteínas *killer* produzidas pelas leveduras-padrão, foi evidenciado em 2,7% (1/37) dos isolados de *C. albicans* da boca de CCSD (Tabela 2). Martins et al. [6] também detectaram esse *killer*-tipo em uma única amostra de *Candida*, todavia pertencente à espécie *tropicalis*, dentre as 36 leveduras de *Candida* da boca de pacientes com periodontite crônica.

Demais estudos envolvendo a avaliação de *C. albicans* frente às toxinas *killer*, isoladas da mucosa da boca têm demonstrado alteração de perfil de sensibilidade das leveduras quando advindas de pacientes submetidos a outros tratamentos, como os neoplásicos. Birman et al.[14] evidenciaram os *killer*-tipos 211 e 611 em 33 isolados de *C. albicans* de indivíduos com carcinoma bucal e Oliveira et al.[1] constataram os *killer*-tipos 511 e 811 em 24 leveduras de *C. albicans* provenientes da boca de pacientes oncológicos.

CONCLUSÃO

A classificação das leveduras do gênero *C. albicans* em diferentes *killer*-tipos, possibilitada pela sensibilidade às toxinas *killer*, facilita o delineamento epidemiológico de colônias em populações diversas, assegurando o conhecimento preciso das leveduras presentes nas infecções fúngicas e nos grupos aqui estudados (crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis pelas crianças com alteração cromossômica) predominou o *killer*-tipo 111.

REFERÊNCIAS

- Oliveira EE, Silva SC, Soares AJ. et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998; 523-27.
- Kogan BL. Mode de action of yeast killer toxin: channel formation in lipid membranes. Nature 1983; 20: 709-11.
- Bendova O. The killer phenomenon in yeasts. Folia Microbiol. 1986; 31: 422-23.
- Maffei CML. Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 1996.
- Ribeiro EL. Aspectos biológicos das leveduras do gênero *Candida* isoladas de candidíase vaginal [Dissertação de Mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 1997.
- Martins CAP, Koga-Ito Cy, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the human oral cavity. Braz J Microb. 2002; 33: 236-40.
- Carneiro IDD, Silva MS, Oliveira BM, Oliveira RQ et al. Atividade killer de micro-organismos leveduriformes contra leveduras patogênicas ao homem. In: Anais/Resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC; 2009; Manaus. Manaus: SBPC; 2009.
- Morace G, Archibusacci C, Sesito M. et al. Differentiation of pathogenic yeast by the killer system. Mycopathologia 1984 :81-5.
- Kreeger-Van Rij. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier; 1984.
- Polonelli L, Archibussacci C, Sestito M. et al. Killer system: a simple method for differentiating *C. albicans*. Sabouraudia. 1983, 15-20.
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M. et al. Production of yeast killer toxin in experimentally infected animals. Mycopathologia 1990,169-75.
- Martins CAP, Santos SSF, LobertoJS, Koga-Ito Cy. et al. Presença *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. Cienc Odontol Bras. 2002: 75-85.
- Ribeiro EL. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down: aspectos fenotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas [Tese de Doutorado]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2008.
- Birman EG. Um breve retrospectivo sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. Rev. Vida Odontol. 1998: 56-9.