

DETECÇÃO DE *CANDIDA ALBICANS* FOSFOLIPIDOLÍTICAS isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down

EVANDRO L. RIBEIRO, C. DE CASTRO CAMPOS, A. M. COSTA CRESPO, JOVIRÊ S. CASTRO, FREDERICO P. ROCHA, MARCELLA ALVES, MARIELLA S. GOULART, CLÉVER CARDOSO, WESLEY FERREIRA, PLÍNIO LÁZARO NAVES, A. JOSÉ SOARES, SIMONE R. MIRANDA, FABIANA C. PIMENTA
Departamento em Medicina Tropical e Microbiologia/Imunologia. Universidade Federal de Goiás. Brasil

RESUMO/SUMMARY

A infância é tida como uma das fases de vida mais propícia a ocorrência de infecção por leveduras do género *Candida*. Nas crianças com síndrome de Down, além dos fatores pré-disponíveis a candidíase bucal; macroglossia, incompetência muscular bucal, constantes doenças respiratórias, dificuldade motora e défice imunológico são mencionados como elementos adicionais ao acometimento desta enfermidade fúngica. Verificou-se que as crianças acometidas desta síndrome são acentuadamente mais colonizadas por cepas de *Candida* que as crianças desprovidas da síndrome. Neste estudo objetivou-se verificar a prevalência de *Candida* produtoras de fosfolipase na saliva de crianças com síndrome de Down. *Candida albicans* foi a única espécie de *Candida* identificada. A produção de fosfolipase foi detectada em cepas isoladas de ambos grupos de estudo e controlo. Entretanto, as cepas isoladas do grupo de crianças com síndrome de Down apresentaram-se mais fortemente fosfolipidolíticas.

Palavras-chave: Candidíase bucal, *C. albicans*, Fosfolipase, Síndrome de Down

DETECTION OF ISOLATED PHOSPHOLIPIDOLITIC *CANDIDA* *ALBICANS* from the saliva of children with Down's syndrome

The childhood is one of the most propitious period of the life to the occurrence of infection by yeasts of the genus *Candida*. In children with Down's syndrome, besides the predispose factors to bucal candidiasis; macroglossia, bucal muscular incompetence, frequent respiratory diseases, motor difficulty and immunologic deficit are mentioned as additional elements for this fungus disease. It was verified that the children attacked by this syndrome have much more strains of *Candida* than other children. The aim of this study was to detect the prevalence of phospholipase producer, *Candida* on the saliva of children with Down's syndrome. *Candida albicans* was the only identified specie of *Candida*. The phospholipase production was found in isolated strains from both of study and control. However, the isolated strains of the group of children with Down's syndrome have strongly present phospholipidolitic.

Key words: Bucal candidiasis, *C. albicans*, Phospholipase, Down's syndrome.

INTRODUÇÃO

Candidíase bucal é uma das infecções fúngicas mais comuns, acometendo os indivíduos humanos em quaisquer fases de vida, embora o maior número de casos seja geralmente relatado na infância ou velhice¹⁻⁴. O desencadeamento desta patologia leveduriforme provavelmente é influenciado pela presença das leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal do homem desde o nascimento, associada as alterações tóxicas provocadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, além dos processos fisiológicos da boca, como a mastigação^{3,5-7}.

As alterações anátomo-fisiológicas, presenciadas na cavidade bucal de crianças com síndrome de Down, parecem atuar como fatores adjuvantes na preservação das cepas de *Candida* na boca. Estagnação salivar decorrente de incompetência muscular, macroglossia, dificuldade motora e freqüentes infecções respiratórias são apontados como elementos influenciadores para a maior colonização de *Candida* na boca destes indivíduos^{2,3,5-9}.

As crianças com síndrome de Down apresentam ainda comprometimento da resposta imunológica nata e adquirida, através das alterações dos isótopos das imunoglobulinas, fazendo com que as leveduras do gênero *Candida* possam atuar frequentemente no estabelecimento de processos infecciosos bucais^{3,10,11}.

Ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na boca de crianças com síndrome de Down tem sido relatada numa incidência de 69% dos casos analisados e associação com candidíase bucal de 40%¹².

Fatores ligados aos isolados da *Candida*, como a capacidade de produção de exoenzimas, atuam como características necessárias ao estabelecimento do processo de colonização e infecciosidade por estas leveduras. Fosfolipase é uma das enzimas extracelulares produzidas pelas cepas de *Candida albicans*. Bioquimicamente, é condicionada por um pH ácido (3,6 a 4,7) e inversamente dependente da concentração de carboidratos como a glicose ou lactose. Participa no controle de crescimento do fungo, em decorrência da sua presença nas extremidades das formas miceliais e atua também na danificação dos constituintes lipídicos da estrutura celular integrantes da superfície da mucosa infectada^{4,13-18}.

Considerando os aspectos assinalados, o presente trabalho teve como objetivo correlacionar a prevalência e detectar a ocorrência de cepas de *Candida* produtoras de fosfolipase isoladas da boca de crianças com e sem síndrome de Down.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas 30 amostras de secreção salivar de crianças com síndrome de Down atendidas na Unidade

Odontológica Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) na cidade de Goiânia/Goiás - Brasil. Outras 30 amostras de secreção salivar de crianças sem síndrome também foram analisadas, constituindo o grupo controle.

Dos pais destas crianças foram obtidas informações sobre: idade e uso de medicamentos, além das crianças serem submetidas a exame clínico e odontológico.

Cepas de *Candida*

A secreção salivar foi coletada com swabs esterilizados da mucosa jugal das crianças. Em seguida, foi depositada em tubos de ensaio contendo 4 mL de soro fisiológico e transportado ao Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás (UFG) na cidade de Goiânia/Goiás-Brasil. Após a homogenização de cada solução de salina, contendo secreção salivar dispersa no meio, este material foi semeado em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e mantido a temperatura ambiente por 15 dias. As colônias leveduriformes de cor branco-amareladas, cremosas e úmidas, que se desenvolveram, foram identificadas pela pesquisa de tubos germinativos em soro fetal bovino, formação de clasmidósporos em ágar corn-meal acrescido de tween 80 e realização de testes bioquímicos de assimilação e fermentação de carbono¹⁸.

Análise estatística

A análise foi efetuada aplicando o teste de X²(Qui-quadrado) e os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Fosfolipase

A produção de exoenzima por cultivos de *Candida* foi detectada para fosfolipase em ágar Sabouraud dextrose acrescido de gema de ovo, após incubação a 37°C por 96 h. A leitura dos cultivos-teste e da cepa padrão (*Candida albicans* CBS 562), gentilmente cedida pela micoteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP)-Brasil, foi realizada com base na produção da zona de precipitação ao redor do ponto de inoculação dos cultivos de *Candida*. A atividade enzimática (Pz) decorreu da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia acrescido da zona de precipitação (dcp). Os resultados foram classificados em negativo (Pz = 1), positivo (0,64 ³ Pz < 1) e fortemente positivo (Pz < 0,64)¹⁵.

RESULTADOS

Isolados de *Candida*

Das 60 amostras de secreção salivar coletadas da mucosa bucal, sendo 30 de crianças com síndrome de Down e

as outras do grupo controlo, isolou 25(83,3%) cepas de *Candida albicans* no grupo de estudo e 05(16,7%), no grupo controlo ($X^2 = 26,7$; $p < 0,05$). Todas estas crianças apresentavam uma faixa etária de 0 a 10 anos e não possuíam nenhuma lesão bucal, nem faziam uso de qualquer medicamento e no momento, não apresentavam nenhum quadro clínico infeccioso (Quadro I).

Quadro I - Prevalência de cepas de *C. albicans*, distribuídas por faixa etária, isoladas da boca de crianças. Goiânia-GO/Brasil 1999

Idade (anos)	Crianças com síndrome de Down/CCSD (%)*	Crianças sem síndrome de Down/CSSD (%)*
0 - 2	01 (4,0)	-
3 - 5	09 (36,0)	2 (40,0)
6 - 8	12 (48,0)	2 (40,0)
≤ 10	03 (12,0)	01 (20,0)
Total	25(100,0)	05 (100,0)

*Relação estatística entre os grupos CCSD e CSSD ($X^2 = 26,7$; $p < 0,05$).

Fosfolipase

Detectou-se a produção de fosfolipase em 28(93,3%) cepas de *Candida albicans* identificadas neste estudo. No grupo de crianças com síndrome de Down, 22(88,0%) isolados de *Candida* mostraram-se fortemente produtores desta enzima extracelular, enquanto no outro grupo analisado (crianças sem síndrome) foi verificado a capacidade enzimática em 4(80,0%) cepas deste gênero de levedura (Quadro II).

Quadro II - Produção de fosfolipase por cepas de *C. albicans* bucais de crianças com e sem síndrome de Down. Goiânia-GO/ Brasil 1999

Crianças	Pz=1(%)	(0,64 ³ Pz<1)(%)	(Pz<0,64)(%)
com síndrome de Down	01 (4,0)	02 (8,0)	22 (88,0)
sem síndrome de Down	01 (20,0)	-	04 (80,0)
Total	02 (6,7)	02 (6,7)	26 (86,6)

Pz = 1 ausência de produção de fosfolipase por cepas de *C. albicans*

0,64 ³ Pz < 1 cepas de *C. albicans* produtoras de fosfolipase

Pz < 0,64 cepas de *C. albicans* fortemente produtora de fosfolipase

DISCUSSÃO

A frequência de crianças acometidas por síndrome de Down é estimada no Brasil em 1:600 nascimentos². Sua

manifestação é decorrente da trissomia do cromossomo 21 do cariótipo humano, a qual pode ser provocada por não-disjunção, translocação ou ainda mosaicismos cromossômico^{2,3,5-10}. As alterações na boca sofridas por estes indivíduos afetam ossos, língua, dentes, estruturas gengivais e mucosa. Assim, a colonização e/ou patogenicidade por cepas de *Candida* pode ser influenciada pela protrusão da língua, respiração bucal, irritação da mucosa com fissuras linguais e nos cantos labiais, higiene bucal deficiente e problemas respiratórios^{1-3,5-7,9,10}. Outro fator relevante no estabelecimento de candidíase bucal em indivíduos com síndrome de Down é o comprometimento do sistema imunológico. As células killer e linfócitos T apresentam suas funcionalidades afetadas. As taxas de imunoglobulinas IgG₂ e IgG₄ mostram-se baixas predispondo-os a infecções microbiológicas, além da oscilação da taxa de peróxido-desmutase afetar a defesa do organismo a fungos e bactérias, fazendo com que *Candida* e *Staphylococcus* sejam os agentes etiológicos comuns nas patologias bucais¹⁰⁻¹². A prevalência de isolados de *Candida*, na boca das crianças com síndrome de Down, é portanto um provável fator indutor a candidíase bucal^{10,12}. Neste estudo houve um isolamento significativo de amostras de *Candida* no grupo de crianças acometidas desta síndrome quando comparado com o outro grupo de crianças desprovidas desta alteração cromossômica. Este mesmo aspecto foi presenciado por Carstedt et al¹², avaliando o carreamento de leveduras de *Candida* na cavidade bucal de crianças e adolescentes suecos com síndrome de Down, na faixa etária de 7 meses a 20 anos e 6 meses, com incidência de 69% dos 55 indivíduos portadores desta alteração cromossômica analisados em relação aos 35% no grupo controlo. Em pacientes com algum comprometimento local ou sistêmico da boca (uso de prótese dentária, estomatite, neoplasia de orofaringe ou síndrome da imunodeficiência adquirida), o isolamento de leveduras tem atingindo a incidência de até 85%^{1,4,16,17}. Entretanto, em indivíduos não acometido de alterações cromossômicas e sem lesões na boca, a ocorrência de colonização de *Candida* tem variado de 20 a 55%^{1,4}. Prevalência um pouco acima a presenciada em nosso trabalho.

Entre os diversos fatores correlacionados a virulência de *Candida* (aderência, dimorfismo, variabilidade fenotípica e produção de toxinas e enzimas), a detecção de cepas produtoras de fosfolipase demonstra a capacidade deste fungo de estabelecer processos infecciosos^{13-15,17}. Em pacientes fumantes, diabéticos e imunodeprimidos, a produção de fosfolipase tem sido presenciada em 76 a 98% dos isolados de *Candida albicans* da mucosa bucal^{4,16,17}. Na comparação entre crianças com e sem síndrome de

Down, as leveduras de *Candida* tem aproximadamente um mesmo índice percentual de cepas produtoras de fosfolipase. No entanto, os isolados provenientes do grupo-teste (crianças com síndrome de Down) mostraram-se *in vitro*, quando analisada cada cepa de *Candida* isoladamente, maior capacidade produtora desta enzima extracelular; o que torna estas crianças portadoras destes isolados de *Candida* na boca presumivelmente mais suscetíveis a candidíase bucal.

BIBLIOGRAFIA

1. ARENDORF TM, WALKER DM: Oral candidal population in health and disease. *Brit Dent J* 1979;147: 267-72
2. PIRES CC, SILVA FA, NETTO JV: Síndrome de Down – Implicações odontológicas e possibilidades terapêuticas. *Anais do II Cong Bras e I Enc Latino-Americ. sobre síndrome de Down* 1997:59-62
3. ROZONE G, MUSTACCHI Z: *Síndrome de Down-Aspectos Clínicos e Odontológicos*. São Paulo. CID Ed., 1990, 248 p.
4. SAMPALIO MCC: *Aspectos clínicos da mucosa bucal de pacientes com carcinoma epidermóide de boca, sua correlação com microbiota fúngica e sorotipos de Candida albicans antes e durante a radioterapia*. São Paulo. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/Brasil. 1986; 147 p.
5. BACHESCHI ICC: Síndrome de Down (Mongolismo) In: DIAMENT, A. & CYPEL, S. *Neurologia Infantil*. 2a ed. Rio de Janeiro. Ed. Ateneu 1990; p. 327-36
6. CUTRESS TW: Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol* 1971; 16(10): 1345-55
7. SILVA RM: *Estudo clínico de 128 casos de mongolismo*. São Paulo. Dissertação de Mestrado do Departamento de Biológico Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/Brasil 1970; 120 p.
8. WEBB BC, THOMAS CJ, WILLCOX MDP, HARTY DWS, KNOX KW: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Australian Dent J* 1998; 43(3):160-6
9. ZAMBONI C, MINGARELLI R, MAGI M, BOREA CM: The oral cavity in Down syndrome. *The J Pedodont* 1990;14(3):139-40
10. COELHO CRZ, LOEVY HT: *Aspectos Odontológicos da Síndrome de Down*. São Paulo. ARS Cvrandi em Odontologia, 1982, p. 9-16
11. <http://www.greatplainslaboratory.com/portuguese/immune.html>
12. CARLSTEDT K, KREKMANOVA L, DAHLLOF G, ERICSSON B, BRAATHEN G, MODEER T: Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. *Int J Paediatr Dent*: 1996; 6(2): 95-100
13. GHANNOUM MA, ABU-ELTEEN KH: Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* 1990; 33: 265-82
14. ODDS FC: *Candida and Candidosis*. 2a ed. London, Baviillière Tindall, 1988, 468 p.
15. PRINCE MF, WILKINSON ID, GENTRY LO: Plate Methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982;20:15-20
16. QUIRINO MRS: *Estudo clínico e microbiota fúngica da cavidade bucal de diabéticos controlados e não controlados*. Taubaté, 1990. 54 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté/São Paulo/Brasil.
17. SILVEIRA FRX, BIRMAN EG, PAULA CR, BATISTA JM: Proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers) *R Iber Micol* 1993;10:105-8
18. KREGER-van RIJ NJW: *The yeast: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier 1984; 1082 p.