

# AVALIAÇÃO DO PERFIL PATOGENICO DE CEPAS DE CANDIDA SPP ISOLADAS DE PACIENTES HIV POSITIVO<sup>1</sup>

Maria Wendiane Gueiros Gaspar<sup>2</sup>

Thiago Moura de Araújo<sup>3</sup>

## RESUMO

A infecção pelo HIV modifica o sistema imunológico de modo a alterar e diminuir a eficácia das defesas naturais do organismo humano. A infecção por *Candida* é caracterizada dentro das infecções oportunistas e acarreta diversos prejuízos imunológicos para as pessoas que vivem com HIV/AIDS (PVHA). Tendo em vista que a *Candida* caracterizada como produtora de fosfolipase e atividade hemolítica estão associadas a um prognóstico desfavorável, acredita-se que os isolados clínicos de pacientes que vivem com HIV/AIDS liberam altas quantidades de enzimas produtoras de atividade hemolítica e fosfolipase, possuindo uma possível resistência ao tratamento. Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade hemolítica e fosfolipase de cepas de *Candida* isoladas de pacientes HIV positivo. Concerne um estudo descritivo, exploratório e transversal, com amostra constituída por 106 participantes dos quais em posterior análise apenas 43 apresentaram resultado positivo para *Candida spp*. Os 43 positivos para *Candida* foram caracterizados nas seguintes espécies: *C.albicans* (74,4%), *C.tropicalis* (9,3%), *C.glabrata* (2,3%), *C. parapsilosis* (2,3%) e *Candida sp* (11,6%), todos foram testados para atividade enzimática de fosfolipase e atividade hemolítica. Após análise podemos concluir que a espécie de *C.albicans* apresenta maior atividade enzimática (hemolítica e fosfolipase) do que as cepas não-*albicans*, podendo ter maior capacidade proliferativa em uma infecção pela presença deste fator de virulência. Ressalta-se também que, segundo alguns achados na literatura, o processo de caracterização enzimática pode ser um marcador de prognóstico para uma melhor condução terapêutica.

**Palavras-chave:** Candidíase, Atividade Hemolítica, Fosfolipase, HIV

---

<sup>1</sup> Artigo submetido à coordenação do curso de Enfermagem da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como exigência para obtenção do título de bacharel em Enfermagem;

<sup>2</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. Instituto de Ciências da Saúde. Acadêmica de Enfermagem. E-mail: m.wend@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. Enfermeira. Doutora em Enfermagem. Docente do Instituto de Ciências da Saúde. Orientadora da pesquisa. E-mail: thiagomoura@unilab.edu.br

**PATHOGEN PROFILE EVALUATION OF CANDIDA SPP CEPAS ISOLATED  
FROM HIV POSITIVE PATIENTS**

**Maria Wendiane Gueiros Gaspar**

**Thiago Moura de Araújo**

**ABSTRACT**

HIV infection modifies the immune system to alter and diminish the effectiveness of the human body's natural defenses. Candida infection is characterized within opportunistic infections and causes several immunological impairments for people living with HIV / AIDS (PLWHA). Given that Candida characterized as a phospholipase producer and hemolytic activity are associated with an unfavorable prognosis, it is believed that clinical isolates of patients living with HIV / AIDS release high amounts of hemolytic activity and phospholipase producing enzymes, having possible resistance to treatment. Thus, the aim of the study was to evaluate the hemolytic activity and phospholipase of Candida strains isolated from HIV positive patients. It is a descriptive, exploratory and cross-sectional study, with a sample of 106 participants, of which only 43 were positive for Candida spp. The 43 Candida positives were characterized in the following species: C.albicans (74.4%), C.tropicalis (9.3%), C.glabrata (2.3%), C. parapsilosis (2.3%) and Candida sp (11.6%) were all tested for phospholipase enzymatic activity and hemolytic activity. After analysis we can conclude that the species of C.albicans has higher enzymatic activity (hemolytic and phospholipase) than non-albicans strains, and may have greater proliferative capacity in an infection due to the presence of this virulence factor. It is also noteworthy that, according to some findings in the literature, the enzymatic characterization process may be a prognostic marker for a better therapeutic conduction.

**Key words:** Candidiasis, Hemolytic Activity, Phospholipase, HIV

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo HIV modifica completamente o sistema imunológico de modo a alterar e diminuir a eficácia das defesas naturais do organismo humano. O fato da resposta imunológica não estar restaurada por completo, haja vista o comprometimento prévio, destaca-se o aumento recorrente de co-morbidades que não apresentam correlações com HIV, tais como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, distúrbios metabólicos, osteoporose, assim como algumas neoplasias. Ao se levar em conta que a maioria dessas patologias ocorrem em indivíduos idosos, estima-se que de alguma maneira o HIV pode antecipar o envelhecimento celular natural (DEEKS,2013).

A epidemia global de AIDS associada a diversas outras Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) têm se apresentado como um grande desafio para a saúde pública, uma vez que dados epidemiológicos demonstram que mais de 190 países com diferentes etnias, crenças e faixas etárias são afetados diretamente por essas condições clínicas (DESSUNTI; REIS, 2012). No Brasil existem cerca de 656.701 casos notificados de AIDS desde o começo da epidemia em 1980, e estima-se que há 718 mil pessoas vivendo com HIV, sendo que 574.000 já diagnosticadas (BRASIL, 2018).

O HIV apresenta-se como um fenômeno global, dinâmico e com alta instabilidade, cujas manifestações têm íntima relação com aspectos do comportamento humano individual e coletivo. Trata-se de uma das principais patologias de origem infecciosa, emergentes e reemergentes da atualidade, com grande magnitude e extensão, causando danos significativos a população, principalmente em questões relacionadas à qualidade de vida (OSEI- YEBOAH et al.,2017).

Acrescido aos diversos problemas fisiológicos, as pessoas com HIV podem sofrer por conta dos diversos estigmas impostos pela sociedade. Sendo atribuído no início da epidemia esse estigma social a grupos específicos como profissionais do sexo e gays. Ademais, há alguns anos atrás o diagnóstico do HIV era considerado uma sentença de morte. Entretanto nos dias atuais os avanços terapêuticos têm contribuído para o prolongamento da sobrevivência de pessoas que vivem com HIV/AIDS (PVHA) (DEEKS,2013).

Atualmente o HIV/AIDS passou a ser considerado uma doença crônica, porém, outros sintomas que afetam diretamente a qualidade de vida das pessoas merecem atenção. Nesse sentido, sabe-se que a qualidade de vida passa pelo estabelecimento de algumas funções fisiológicas, entre as quais cita-se a qualidade do sono (JUNQUEIRA et al., 2008).

Em patologias crônicas é comum a ocorrência de distúrbios relacionados à qualidade

do sono. Nessa perspectiva a insônia pode ser uma constante, associado a sonolência diurna excessiva (SDE) acompanhada de dificuldade de desenvolvimento das atividades diárias de modo satisfatório. Pondera-se ainda a ansiedade gerada pelo adoecimento, prejudicial ao repouso e sono humano (JUNQUEIRA et al., 2008).

A qualidade do sono apresenta-se como um dos indicadores de saúde mais importantes atualmente, estabelecendo associações com o estado de saúde e bem-estar. Fato é que a má qualidade do sono é um fator predisponente para distúrbios cardiovasculares, metabólicos e relacionados a qualidade de vida. Hoje compreende-se que o sono está envolvido com a manifestação de diversas alterações nas funções cognitivas, psicológicas, imunológicas, metabólicas, capacidade de desenvolver atividades laborais e qualidade de vida. Inversamente, muitos aspectos sociais, clínicos e culturais podem interferir na quantidade e/ou qualidade do sono (TUFIK, 2008; ARAÚJO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014).

Na análise de causalidade entre sono e indicadores de saúde, mais importante que a duração é a qualidade do sono. Este conceito leva em conta a interação de quesitos como avaliação pessoal subjetiva, latência, duração, eficiência e a presença de distúrbios do sono. Além de destacar o uso de medicamentos psicotrópicos e a sonolência diurna excessiva (SDE) (BERTOLAZI et al., 2011).

Atualmente considera-se que o sono exerce diversas funções no organismo humano, tais como remodelação e consolidação de memória, produção de hormônios relacionados ao crescimento e inibição de hormônios relacionados ao estresse (AFONSO,2008). Por se tratar de acontecimentos ligados ao sistema neurológico, o sono é indispensável para que todas as funções do organismo se desenvolvam plenamente. Por outro lado, a privação do sono interfere diretamente no surgimento de diversas alterações tais como: fadiga, perda de capacidade de concentração, aumento de sensibilidade a dor, ansiedade, nervosismo, alucinações, inapetência, risco de acidente e demora de resposta do sistema imune (PÉREZ-OLMOS et al., 2012).

A fisiopatologia dos distúrbios do sono em PVHA ainda não está completamente esclarecida, mas estes podem ser relacionados com a capacidade do vírus de infectar o Sistema Nervoso Central (SNC), atrelado ao impacto da Terapia Antirretroviral (ATARV), problemas de saúde mental e abuso de substâncias. As alterações do padrão do sono ocorrem em todas as fases da infecção, incluindo as fases assintomáticas, no entanto, os sintomas se intensificam conforme o avanço da infecção sobre o organismo, nesse sentido é importante que todo o acompanhamento dessas pessoas ocorra continuamente (IAN et al.,2015).

A necessidade do sono depende de cada indivíduo e apresenta diferentes variações de

acordo com cada fase da vida. Na fase adulta, para manutenção do bem-estar, saúde física e cognição é preciso ao menos 08 horas de sono por dia, desse modo valores diários de sono menores podem inferir diminuição do desempenho em relação as atividades de vida diária, afetando também funções vitais importantes como a liberação de hormônios (FAIRBROTHER, 2014).

Ao sono sempre foi atribuído durante séculos o caráter restaurador e a capacidade de reestabelecer as funções orgânicas vitais. No entanto, estima-se que este, influencia diretamente nas funções cognitivas, biológicas, psicológicas, imunológicas e metabólicas (ARAÚJO et al., 2013). Nesse sentido, estudos apontam que a qualidade do sono pode influenciar diretamente na capacidade do organismo de responder a agressões externas, esse quadro poderá se agravar em indivíduos imunocomprometidos, como ocorre com as pessoas infectadas por HIV/AIDS (GÁRCIA-CORPAS et al., 2013; CIANFLONE et al., 2012).

Acrescido a isso, outros indicadores tais como sedentarismo, tabagismo, etilismo, sobrepeso, obesidade e sociodemográficos como idade, baixa escolaridade, podem inferir diretamente na qualidade do sono e conseqüentemente trazer impactos negativos para a saúde (TUFIK, 2008).

Dados de meta-análise, apontam que em pessoas que vivem com HIV/ AIDS (PVHA) convivem com uma maior vulnerabilidade para problemas de sono, em virtude, especialmente da terapia anti-retroviral e de questões psicológicas como ansiedade, depressão e estresse (UCHÔA et al., 2018).

Ao investigar a qualidade do sono de PVHA é primordial correlacionarmos quais outros fatores são associados, assim como quais possíveis patologias oportunistas possam surgir. Ademais, marcadores do sistema imunológico ou o crescimento de microrganismos oportunistas devem ser monitorados.

A infecção por *Candida* é caracterizada dentro das infecções oportunista e acarreta diversos prejuízos imunológicos para as PVHA, um estudo do tipo coorte conduzido na Suíça evidenciou que pessoas com esofagite causada por *Candida*, apresentaram diminuição exponencial da produção de células CD4 que fazem parte do sistema imunológico e são o principal alvo do HIV, associado ao número de células CD4 com disfunção. Essas alterações perduraram por mais de dois anos após a infecção, em contrapartida, quando se avaliou PVHA sem a presença da esofagite causada por *Candida*, estes apresentaram melhor recuperação imunológica (STUEHLER, et al., 2016). Esse fato pode ser atribuído a uma disfunção genética que torna as células CD4 mais suscetíveis à infecção causada por *Candida*, além de uma perda precoce de controle imunológico, sobre a infecção fúngica em mucosas

(LIU et al., 2016).

Após levantamento bibliográfico evidenciou-se que o gênero *Candida* é composto por mais de 200 espécies de leveduras, que colonizam os mais diferentes sítios do corpo humano, tais como orofaringe, cavidade bucal, pregas cutâneas, secreções brônquicas e pulmonares, órgãos genitais e fezes, dessas, pouco mais de 20 podem ser nocivas a espécie humana (SCHULZE; SONNENBORN,2009).

Por fazer parte da microbiota humana, infecções por *C.albicans* podem acontecer em indivíduos hígidos, entretanto, infecções por esse gênero de fungos são consideradas oportunistas. Já que essas leveduras são as principais responsáveis por afecções em seres humanos, devido a um déficit ou alterações nos mecanismos de defesa do organismo. Outros fatores como rompimento ou lesões cutâneas e em mucosas, deficiências de células de defesa e transplante de órgão podem potencializar os riscos de infecção fúngica (ROSSI et al., 2011).

A *Candida* é encontrada com bastante frequência na mucosa oral de pessoas saudáveis, com variações de 20-70%, entretanto, o déficit no sistema imunológico pode levar a proliferação da infecção por toda a cavidade oral, esse quadro se potencializa mais em extremos de idade e pessoas com o sistema imunocomprometido (MUSHI et al., 2017).

As lesões em cavidade oral causada pela *Candida* tem íntima relação com o processo de infecção por HIV, uma vez que, este compromete o sistema imunológico. Dito isso, a cândida oral foi descrita na literatura como um dos primeiros indicadores precoces da AIDS, conforme relatos da literatura, 90% PVHA apresentaram pelo menos uma infecção orofaríngea por *Candida* durante a vida (MUSHI et al.,2017). Em PVHA alguns fatores relacionados à candidíase oral, dentre os principais cita-se: índices de T-CD 4 menores que 200 células/mm<sup>3</sup>, elevação de carga viral; ou ainda o uso dos seguintes dispositivos: antibiótico de amplo espectro, sondagem vesical, sonda nasoenteral por longos períodos, cateter venoso central, ventilação mecânica, corticoide, álcool, tabaco (GIOLO,2010).

Ressalta-se que a perda das funções imunológicas podem acontecer em diferentes estágios da infecção por HIV, dentre as quais a infecção por *Candida* Oral (CO) pode se apresentar em mais de 80 % dessa população. Ademais, parece haver aumento do número de espécie de CO resistente aos antifúngicos (MUSHI et al.,2017).

Apesar da complexidade da fisiopatologia da infecção por *Candida*, o diagnóstico não é tão difícil e pode ser realizado por meio de hemocultura, cultura cromogênica, métodos sorológicos e por meio de análise de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) (GIOLO,2010).

Além da realização do diagnóstico, outros testes podem ser aplicados com a finalidade de identificar os fatores de virulência expressados por esse gênero fúngico, pois os mesmos

apresentam interferência direta na patogenicidade da *Candida*, principalmente em relação a capacidade de adesão as células epiteliais. Os principais fatores de virulência presentes na *Candida spp* são a termotolerância, a presença de adesinas que são importantes no processo de adesão ao hospedeiro, expressão de genes de resistência aos antifúngicos, e a produção de enzimas extracelulares, como proteinases e os fatores de virulência que foram destacados no presente estudo, fosfolipases e hemolisinas (CANTÓN et al.,2011; HERNÁNDEZ et al., 2014; MARCOS et al., 2011).

As enzimas de fosfolipase realizam o metabolismo de fosfolípidios que são os principais componentes das membranas celulares, as atividades extracelulares de fosfolipase são de grande importância na invasão do agente patológico nos tecidos, caracterizada pela desintegração das membranas epiteliais, que facilita a ancoragem da hifa para dentro do citoplasma da célula. As fosfolipases como dito anteriormente são capazes de degradar diversos tipos de substratos fisiologicamente importantes como os componentes celulares das mucosas acarretando uma maior patogenicidade (KOGA-ITO et al., 2016; RAMAGE et al., 2004).

Após levantamento bibliográfico, constatou-se que pouco se conhece sobre a atividade hemolítica do gênero *Candida*. Porém faz-se saber que alguns microrganismos utilizam a hemoglobina com uma fonte de sobrevivência e estabelecimento da infecção. Em estudos desenvolvidos foi destacado um potencial patogênico das leveduras através da atividade hemolítica, que leva produção de hemolisinas acarretando a hemólise das hemácias, razão que pode estar associada a disseminação do patógeno e invasão hifal (LUO et al., 2001; NEGRI et al., 2010).

Tendo em vista que as *Candidas* caracterizadas como produtoras de fosfolipases e atividade hemolítica estão associadas a um prognóstico desfavorável, admite-se a hipótese desse estudo, os isolados clínicos de pacientes que vivem com HIV/AIDS liberam maiores quantidades de enzimas produtoras de atividade hemolítica e fosfolipase, possuindo uma possível resistência ao tratamento. Podendo ainda as enzimas avaliadas serem utilizadas com marcador de prognóstico. Desse modo o objetivo do estudo é avaliar a atividade hemolítica e fosfolipase de cepas de *Candida* isoladas de pacientes HIV positivo mal dormidores.

## METODOLOGIA

A natureza desta investigação concerne um estudo descritivo, exploratório e transversal com abordagem quantitativa, o mesmo é parte de um trabalho já desenvolvido que teve com objetivo associar a qualidade do sono de pessoas com HIV/AIDS com o isolamento de *C.albicans* na cavidade oral. A amostra foi composta por pessoas que são acompanhadas no Serviço Ambulatorial Especializado do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) no município de Fortaleza-Ce, esta foi constituída por 106 participantes dos quais em posterior análise apenas 43 apresentaram resultado positivo para o isolamento de *Candida*.

As cepas de *Candida* estavam devidamente armazenadas e preservadas, seguiu-se assim com a identificação das espécies de *Candida*, através da aplicação do método microbiológico CHROMagar Candida Medium, essa é uma técnica que aplica meios seletivos de diferenciação e isolamento fúngico. Com a inclusão de substratos cromogênicos, as colônias passam a apresentar determinadas características, estas, determinam diferenciação por conta da coloração das colônias de *C.albicans*, *C.tropicalis* e *C.krusei* que produzem cores diferentes, possibilitando assim a detecção direta destas espécies de leveduras na placa de isolamento (JABRA-RIZK et al., 2001).

Ao final foram separadas as placas com resultado positivo para *Candida spp*, estas foram repicadas e acondicionadas adequadamente para posterior utilização nos testes enzimáticos. No caso das placas em que não ocorreu o crescimento de colônias de *Candida spp* houve o descarte em até 15 dias, conforme recomendação de descarte de resíduos biológicos (BRASIL, 2004).

Para a determinação da fosfolipase adotou-se a metodologia de Prince (1982) na qual em seus estudos comprovou que o método de placa é fácil e útil em diversos estudos incluindo investigação de larga escala de variedade da atividade de fosfolipase de diferentes isolados de *Candida*. Partindo-se desse princípio, foi realizado o preparo de placas contendo ágar gema de ovo a 30%, compreendendo que todas as cepas deveriam ser avaliadas em duplicata, preparou-se placas grandes nas quais possibilitavam a análise de três cepas e suas duplicatas. O preparo do meio em quantidade adequada para as placas utilizadas foi calculado através da estimativa de 50 mL de meio por placa para 15 placas, assim foi necessário o total de 750mL de meio, sendo estas mL divididas em 690 mL de água destilada e 60 mL de emulsão de gema de ovo, acrescidos ainda, ágar sabouraud 35,25g, Cloreto de sódio (NaCl) 40,25g e Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,5g.

A emulsão de gema de ovo foi preparada da seguinte forma, de início o ovo foi

colocado em álcool 70% por alguns minutos, em seguida quebrado em uma placa de Petri estéril, foram aspiradas 22,5mL de gema de ovo com auxílio de uma seringa, estes foram depositados em um tubo de ensaio com tampa acrescidos de 52,5 mL de água destilada estéril, conseguinte a mistura foi levada ao vortex até a emulsão ficar pronta. O meio composto por água destilada+ágar sabouraud+NaCl+CaCl<sub>2</sub> já dissolvido, foi autoclavado por 15min a 121°C, ao fim deste processo esperou-se que o meio atingisse 50°C para acrescentar a emulsão de gema de ovo. O meio pronto foi distribuído em placas de Petri estéreis e mantido em refrigeração até o momento do uso.

A cepas utilizadas para a avaliação de fosfolipase foram cultivadas 24h antes do teste em Ágar Batata Dextrose a 35°C, os inóculos das cepas foram preparados em solução salina estéril com concentração final de 4 na escala de McFarland. Com o material todo pronto, foram realizados os passos seguintes na cabine de fluxo laminar, pipetou-se cinco microlitros do inóculo em discos de papel filtro esterilizados, em seguida os discos foram dispostos nas placas com o meio ágar gema de ovo. As placas foram incubadas a 35 °C, durante sete dias para posterior determinação da atividade enzimática (Pz).

A interpretação dos resultados se deu através da metodologia de Sidrim (2010) que determina a atividade da fosfolipase (Pz) pelo cálculo da relação entre o diâmetro da colônia fúngica e o diâmetro total, incluindo a colônia e o zona de precipitação. A medição foi realizada com o auxílio de um paquímetro que é uma ferramenta que trabalha com precisão e serve para medir a distância entre dois lados simetricamente opostos de um objeto, aqui se aplica na medição das colônias e halos de precipitação. Assim, quando  $Pz = 1$ , o isolado é fosfolipase negativa; quando  $1 > Pz \geq 0,64$  o isolado é positivo para atividade de fosfolipase; e quando  $Pz < 0,64$ , o isolado é fortemente positivo para esta enzima.

Os mesmos isolados foram testados para a atividade hemolítica, a metodologia utilizada e interpretação de dados ocorreram segundo literatura de Favero (2011) e Luo (2001), na qual preconizam para a avaliação hemolítica o preparo do meio de cultivo com sangue de carneiro, ágar sabouraud e glicose.

O preparo do meio de cultura para avaliação da atividade hemolítica ocorreu com a mistura de ágar, glicose e água destilada em um frasco reagente, depois de homogeneizado o meio foi autoclavado durante 15 minutos a temperatura de 121°C. Com a finalização da esterilização esperou-se que o meio atingisse temperatura de 50°C para que de forma cuidadosa e sob leve agitação o sangue de carneiro fosse depositado no meio de cultivo e distribuído posteriormente nas placas de Petri estéreis.

Levando-se em consideração o quantitativo de cepas e suas duplicações, realizou-se

aproximadamente 352 mL de meio, constituído de 327,36 mL de água e 24,64 mL de sangue de carneiro, na água destilada foram adicionadas 22,88g de ágar sabouraud e 10,56g de glicose.

O preparo do inóculo aconteceu de início 24h antes da realização do teste, na qual as amostras foram repicadas em ágar sabouraud e mantidas na temperatura de 37°C. No dia do teste a colônia de *Candida* foi diluída em 5 mL de salina estéril até obtenção final de 0,5 na escala de McFarland, em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos e descartado o sobrenadante, esse processo foi repetido e ao final foi realizada novamente a suspensão do inóculo em 5 mL de salina estéril sendo conferida a escala de McFarland com 0,5. O cultivo ocorreu com a adição de 10 µL do inóculo nas placas contendo ágar sangue, as placas foram incubadas por 48h a uma temperatura de 37°C.

Os resultados foram colhidos e analisados desta forma: primeiro foram anotados os valores de sobreposição total da cepa, colônia e halo, depois o valor do diâmetro da colônia, as medidas foram realizadas com o paquímetro. Em seguida foi determinado o valor da atividade hemolítica através do cálculo da diferença entre os diâmetros já descritos. Os dados obtidos foram interpretados como atividade hemolítica ausente para aquelas cepas sem halo visível, atividade hemolítica fraca quando halo  $\leq$  1mm, moderada de 1,1 a 1,49mm e atividade hemolítica forte quando halo  $\geq$  1,5mm.

## RESULTADOS

Como relatado anteriormente o estudo realizado é um braço de uma pesquisa já desenvolvida. No estudo de origem a amostra final foi formada por 106 pessoas soropositivas para o HIV em tratamento ambulatorial, composta principalmente por homens, solteiros, cor de pele parda, com atividade de trabalho informal, classe econômica C e que viviam com familiares. No que infere ao sono 67% da amostra foi composta por pessoas com má qualidade do sono.

Com o cultivo das amostras coletadas na cavidade oral de pacientes com HIV mal dormidores, foi possível isolar *Candida* em 43 amostras, que corresponde ao percentual de 40,6% do total de cultivos. Com base na avaliação por Chromagar e microcultivo foi possível constatar algumas espécies do gênero *Candida* nas cepas isoladas, com destaque para as do tipo *C.albicans* que compreenderam 74,4% das cepas, como apresenta a Tabela 01.

**Tabela 01. Espécies do gênero *Candida* isoladas na cavidade oral de pacientes HIV positivo mal dormidores.**

<b>Micro organismo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Candida albicans</i>	32	74,4
<i>Candida tropicalis</i>	4	9,3
<i>Candida glabrata</i>	1	2,3
<i>Candida parapsilosis</i>	1	2,3
<i>Candida sp.</i>	5	11,6

Quanto a avaliação de atividade de fosfolipase extracelular, observou-se que dos 43 isolados clínicos 72% (31) apresentaram liberação de fosfolipase extracelular. As 43 cepas cultivadas foram classificadas de acordo com Pz em negativo para fosfolipase Pz=1 com total de 12 cepas (27,9%), cepa produtora de fosfolipase  $1 > Pz \geq 0,64$  foram classificadas 11 amostras (25,5%) e cepa com alta atividade de fosfolipase  $Pz < 0,64$  com totalde 20 isolados (46,5%).

No que diz respeito à produção de fosfolipase em *Candida* do tipo *Albicans* obteve-se o quantitativo de 26 cepas produtoras de fosfolipase que compreende 81,25% das cepas da espécie, as produtoras de fosfolipase do tipo *Albicans* ficaram divididas em 21,87% produtoras de fosfolipase e 59,37% em cepas com atividade de fosfolipase forte (TABELA 02). Os isolados clínicos não-albicans apresentaram atividade de fosfolipase em alguma de suas cepas com exceção da espécie *C.Glabrata* que sua única cepa foi considerada negativa para fosfolipase.

Com a classificação da produção de fosfolipase das espécies encontradas nos isolados clínicos de acordo com Pz, percebeu-se que além da *C.albicans* como citado anteriormente, as cepas do tipo *Candida sp* também possuem em sua maioria atividade de fosfolipase, o que difere da *C.Tropicalis* que 75% de suas cepas foram consideradas como não produtoras de fosfolipase (TABELA 02).

**Tabela 02. Classificação da produção de fosfolipase de acordo com Pz de cepas isoladas de espécies de *Candida* .**

Microrganismo	N	Pz 1		Pz 2		Pz 3	
		N	%	N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	32	6	18,75	7	21,87	19	59,37
<i>Candida tropicalis</i>	4	3	75	1	25	-	-
<i>Candida glabrata</i>	1	1	100	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	-	-	1	100	-	-
<i>Candida sp.</i>	5	2	40	2	40	1	20

NOTA: Foi considerado Pz 1 cepas não produtoras de fosfolipase, Pz 2 cepas produtoras de fosfolipase, Pz 3 cepas com atividade de fosfolipase forte.

Dentre os 43 isolados do gênero *Candida* 32 (74,42%) apresentaram atividade hemolítica caracterizada como forte. Os resultados seriam ponderados como atividade hemolítica ausente para aquelas cepas sem halo visível, atividade hemolítica fraca quando halo  $\leq 1$ mm, moderada de 1,1 a 1,49mm e atividade hemolítica forte quando halo  $\geq 1,5$ mm. Porém com a interpretação dos resultados deste estudo, considerou-se apenas o primeiro e o ultimo, atividade hemolítica ausente para aquelas cepas sem halo visível e atividade hemolítica forte quando halo  $\geq 1,5$ mm. Pois nenhuma das cepas das diferentes espécies de *Candida* apresentou resultados intermediários, ou seja, as cepas não apresentavam atividade hemolítica ou apresentavam atividade forte.

A análise da atividade hemolítica foi significativa nas *Candidas* do tipo *C.albicans*, pois 75% das cepas foram consideradas como produtoras de forte atividade hemolítica, bem como nas do tipo *Candida tropicalis*, *C.glabrata* e *C.parapsilosis* que apesar do quantitativo de cepas ser bem inferior apresentaram resultado de 100% de atividade hemolítica. Em contrapartida os isolados da espécie *Candida sp* apresentaram em 60% das cepas ausência de atividade hemolítica.

**Tabela 03. Atividade Hemolítica de cepas isoladas de *Candida* de acordo com a espécie.**

Microrganismo	N	Presente		Ausente	
		N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	32	24	75	8	25
<i>Candida tropicalis</i>	4	4	100	-	-
<i>Candida glabrata</i>	1	1	100	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	100	-	-
<i>Candida sp.</i>	5	2	40	3	60
<i>Candida</i>	43	32	74,42	11	25,58

Quando analisadas as atividades de fosfolipase e atividade hemolítica concomitantes

observa-se que as cepas de pessoas com HIV mal dormidores possuem grande potencial enzimático considerando que nas cepas do gênero *Candida* 74,42% destes apresentam forte atividade hemolítica e 72,09% atividades de fosfolipase. São destacadas nesse cenários as *C.albicans* que são mais prevalentes na amostra e possuem considerável atividade enzimática (TABELA 04).

**Tabela 04. Presença de atividade hemolítica e fosfolipase de cepas isoladas da cavidade oral de pacientes com HIV mal dormidores de acordo com a espécie.**

Micro organismo	N	At.Hemolítica		Fosfolipase	
		N	%	N	%
<i>Candida</i>	43	32	74,42	31	72,09
<i>Candida albicans</i>	32	24	75	26	81,25
<i>Candida tropicalis</i>	4	4	100	1	25
<i>Candida glabrata</i>	1	1	100	-	
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	100	1	100
<i>Candida sp.</i>	5	2	40	3	60

## DISCUSSÃO

A predominância da espécie *C.albicans* (74,4%) entre isolados de *Candida* no estudo corrobora com dados presentes na literatura. Na pesquisa realizada por de Andreola et al (2016), foram obtidos no total 35 isolados clínicos provenientes da cavidade oral, destes 77% foram classificados como *C.albicans*, o estudo possuía com um de seus objetivos investigar as espécies de *Candida* causadoras de infecções orais. O dado foi confirmado em um outro estudo realizado com 37 cepas colhidas de diferentes sítios anatômicos (fezes, urina e boca), nesta o total de cepas da espécie *Albicans* foi de 31 aproximadamente 80% do total da amostra coletada que passou por testes de fosfolipase e resistência a antifúngicos.

As espécies de cândidas não-*Albicans* (25%), *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* e *Candida sp* encontradas nos isolados clínicos da cavidade oral em quantidades relativamente reduzidas são validadas no estudo de Andreola et al (2016) que dentre as cepas da cavidade oral cultivadas, 22% eram pertencentes as espécies de *C.tropicalis* e *C.parapsilosis*, esta ultima foi destacada pelos autores por ser de caráter emergente nas candidemias, relacionada principalmente com o uso de cateteres e má higiene das mãos dos profissionais de saúde.

Realizada busca na literatura identificou-se que a produção de enzimas extracelulares é considerada como um dos principais fatores de virulência para o desenvolvimento das infecções oportunistas, em especial na candidíase oral. A capacidade das leveduras para mudar o tipo de relação com o hospedeiro, depende de vários fatores de virulência, incluindo a produção de fosfolipases (Costa et al., 2009), que como dito anteriormente possibilita o aumento da capacidade de adesão e da taxa de mortalidade além de causar danos na membrana da célula hospedeira (Samaranayake et al., 2005).

A produção de atividade de fosfolipase segundo a literatura era característica apenas das espécies de *C albicans*, como no estudo de Marcos-Arias et al (2011) que reportou que as espécies não-albicans não produziam fosfolipase. Entretanto é conhecido que outras espécies de *Candida* também produzem esta enzima, geralmente em quantidades menores (Ghannoum, 2000). A pesquisa constatou que das 43 cepas isoladas de 5 diferentes tipos de *Candida* aproximadamente 72% foram classificadas como produtoras de fosfolipase compreendidas nas espécies de, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida sp*, a única especie que não apresentou fosfolipase foi *Candida glabrata*. Fato semelhante aconteceu no estudo de SIDRIM (2010), no qual todas as cepas de *Candida albicans* isoladas apresentaram atividade de fosfolipase, quanto as *Candida não-albicans*, 40% foram positivo

para produção de fosfolipase classificadas nas espécies de *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* e *C.krusei*.

Algumas literaturas apresentam que a atividade da fosfolipase em *Candida Albicans* está associada à superfície celular das células de levedura. A possível quebra de células de fosfolípido leva subsequente produção de uma substância prejudicial às membranas celulares, que poderia desempenhar um papel danoso na célula hospedeira, assim infere o motivo de em varias pesquisa a *C.albicans* apresentar sempre valores de fosfolipase significantes. Neste estudo as cepas cultivadas de *Candidada Albicas* 32 apresentaram 81% de fosfolipase, distribuidas em 7 isolados com atividade de fosfolipase e 19 cepas com atividade de fosfolipase forte. Em concordância com nosso estudo Andreola et al (2016) confirmou na análise dos seus isolados clínicos percentual maior de fosfolipase nas *C.albicans* com 9 cepas positivas para fosfolipase, dentre as quais 7 foram consideradas produtoras forte e 2 produtoras de atividade moderada. Quanto as não-*albicans*, os autores acreditam que a atividade de fosfolipase existe minimamente quando comparada com as *C.albicans*.

Ao ser avaliada a atividade enzimática de fosfolipase é possível perceber a formação de uma densa zona branca de precipitação distinta e bem definida ao redor das colônias de isolados positivos para a fosfolipase. Nas cepas principalmente de *C.albicans* positivo para atividade de fosfolipase essa precipitação é melhor distinguida. Isto ocorre provavelmente devido a formação de um complexo de cálcio com os ácidos graxos liberados pela ação de fosfolipase nos fosfolipídios presentes na gema de ovo, meio que se deu o cultivo. Prince et al (1982) ao testar a metodologia empregada na avaliação da atividade de fosfolipase, realizou estudos de isolados de diferentes locais do mesmo paciente com a finalidade de confirmar que para qualquer paciente a atividade da fosfolipase detectada pelo método de placa foi semelhante, independentemente da fonte do isolado. Com isso, o teste empregado pode ser utilizado com um marcador prognóstico, principalmente tratando-se de infecções oportunistas em pacientes com HIV, visto que produção de fosfolipase pode ser considerada como um fator de patogenicidade, porém ainda são necessários estudos que estabeleçam concretamente o papel da fosfolipase no dano a célula hospedeira.

Assim como a fosfolipase, a produção de atividade hemolítica é caracterizada com um fator de virulência na infecção por *Candida*. Pouco se sabe sobre este mecanismo enzimático, porém acredita-se que as hemolisinas são responsáveis pela quebra das hemácias gerando compostos ferrosos ou íons de ferro com a finalidade de proliferação da infecção (Luo et al 2004). A avaliação da atividade hemolítica de *C.albicans* é relatada na literatura a alguns anos. Porém percebe-se o numero de estudo sobre atividade hemolítica de espécies não-

albicans de *Candida* ainda é muito pequeno, pois não é considerado significativo por alguns pesquisadores fato que deve ser mudado.

Em estudo desenvolvido Luo et al (2001), avaliou atividade hemolítica em um amplo espectro do gênero *Candida* em 14 espécies diferente, no qual foi comprovado produção de hemolisinas em algumas cepas isoladas de todas as espécies. Entre espécies de *Candida* algumas demonstraram atividade hemolítica mais significante que as outras espécies *C.albicans*, *C.dublinskiensis*, *C.kefyr* e *C.tropi-calis* deve-se ter em mente que existem hemolisinas específicas da espécie que podem variar em tamanho, portanto, afetar a taxa de difusão da cepa.

O estudo citado anteriormente ajuda a comprovar os achados dessa pesquisa, assim como no estudo Luo et al (2001) as cepas isoladas de diferentes espécies de *Candida* apresentaram atividade hemolítica, do total de 43 cepas 32 apresentaram forte atividade hemolítica que corresponde a aproximadamente 75% da amostra divididos nas especies *Candia albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida sp*, e *Candida glabrata*.

A pesar de todas espécies de cepas apresentarem atividade hemolítica, considera-se pelo quantitativo de cepas cultivadas, que os isolados de *C.albicans* possuem maior atividade hemolítica quando comparado as demais espécies. Neste estudo as cepas de *C.albicans* apresentaram em 75% atividade hemolítica caracterizada como forte. Em seu estudo Tadiello et al (2016) confirmou achado parecido, com um total de 45 cepas cultivadas da cavidade oral classificadas como 40 *C.albicans* e 5 não-*albicans* após teste para atividade hemolítica, foi observado resultado significativo para forte produção de atividade hemolítica para as cepas de *C.albicans*. Entretanto, em pesquisa realizada com o objetivo da avaliar a atividade proteásica e hemolítica Varela e Macêdo (2016) constataram um quantitativo maior de atividade hemolítica para as cepas da espécie *C. parapsilosis*, já citada na literatura como sendo a mais envolvida a biofilmes e dispositivos médico-invasivos. Luo et al (2001) pondera ainda em seu estudo que cepas de *C. albicans* e *C. dublinskiensis* parecem ser as mais produtoras de hemolisinas, validando mais uma vez o fato da *C.albicans* apresentar maior atividade hemolítica.

Considera-se importante avaliar a relação entre a virulência e o grau de produção de atividade hemolítica entre isolados patogênicos e comensais de *Candida*, compreendendo que a avaliação pode ajudar na tomada de decisão do método terapêutico e uma melhor resposta do organismo. Foi possível identificar neste estudo que as cepas de modo geral apresentaram boa atividade hemolitica e fosfolipase. Cepas *Candia Albicans* apresentaram alta atividade hemolítica e de fosfolipase, comprovando-se com os estudos disponíveis na literatura. Os

isolados de *Candida Tropicalis* apresentaram alta atividade hemolítica e baixa atividade de fosfolipase, a única cepa isolada da espécie *Candida Parapsilosis* apresentou as duas atividades enzimáticas, os isolados de *Candida sp* apresentaram maior atividade de fosfolipase 60% e atividade hemolítica em apenas 40% da amostra a *Candida glabrata* em sua única cepa só apresentou atividade hemolítica.

## CONCLUSÃO

Após análise descritiva dos resultados, podemos concluir que a espécie de *C.albicans* apresenta maior atividade enzimática (hemolítica e fosfolipase) do que as cepas não-*albicans*, podendo ter maior capacidade proliferativa em uma infecção pela presença deste fator de virulência. Ressalta-se também que segundo alguns achados na literatura o processo de caracterização enzimática pode ser um marcador de prognóstico para uma melhor condução terapêutica.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, P. A relação entre os padrões do ciclo sono-vigília e os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Lisboa, 2008. 149 f. Disponível em [ttp://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1019/3/ulsd\\_tm\\_17324\\_RE.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1019/3/ulsd_tm_17324_RE.pdf).

Andreola, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral Rev Odontol UNESP. v.45 n.4 p:219-226, 2016.

ARAÚJO, M. F. A. et al. Avaliação da qualidade do sono de estudantes universitários de Fortaleza-CE. *Texto & contexto enfermagem*, v.22, n.2, pp.352-360, 2013. DOI:.org/10.1590/S0104-07072013000200011.

ARAÚJO, M. F. M. et al. Health indicators associated with poor sleep quality among university students. *Revista da Escola de Enfermagem*, v. 48, n. 6, p. 1082–1089, 2014.

BERTOLAZI, A.N. Tradução, adaptação cultural e validação de dois instrumentos de avaliação do sono 2008. Tese de Mestrado (Pós-graduação em Medicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília, p. 412. 2018. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>> acesso em: 20 de jan. 2019.

BUYSSE, D. J. et al. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*, v,28, n.2,p. 193-213. 1989.

CANTÓN, E. et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. v.55, n.12 p.5590-6, 2011.

CIANFLONE, N.F.C. et al. Prevalence and Factors Associated With Sleep Disturbances Among Early-Treated HIV-Infected Persons. *Clinical Infectious Diseases*, v, 54, p.1485-1494, 2012.

DEEKS, S.G., R. TRACY, AND D.C. Douek, Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*, v. 39, n. 4, p. 633-45, 2013.

DESSUNTI E, M; REIS, A.O.A. Vulnerabilidade às DST/AIDS entre estudantes da saúde: estudo comparativo entre primeira e última série. *Ciência, Cuidado e Saude*, v.11, p. 274-283, 2012.

FAIRBROTHER, K. et al. Effects of exercise timing on sleep architecture and nocturnal blood pressure in prehypertensives. *Vascular Health and Risk Management*, v.10, p. 691-698, 2014. doi: 10.2147/VHRM.S73688.

FAVERO, D. Et al. Hemolytic Factor Production by Clinical Isolates of *Candida* Species. *Curr Microbiol* 68:161–166, 2014.

GÁRCIA-CORPAS J.P.; et al. Prevalence and associated factors to insomnia and poor sleep

in patients with HIV/AIDS at Seville, Spain. *Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, v.20: p.195-202, 2013.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 46, n. 3, p. 225-234, junho 2010.

IAN, E. et al. The burden of HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) in the Asia-Pacific region and recommendations for screening. *Asian Journal of Psychiatry*, v.22, p.182-9. 2016. DOI: 10.1016/j.ajp.2015.10.009.

JUNQUEIRA, P. et al. Women living with HIV/AIDS: sleep impairment, anxiety and depression symptoms. *Arquivos da Neuro-Psiquiatria*, v. 66, n.4, p. 817-20, 2015.

KOGA-ITO C.Y. et al Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006 Apr;161(4):219-23. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-005-0001-x>. PMID:16552484.

LIU, F. et al. Sequential Dysfunction and Progressive Depletion of *Candida albicans* - Specific CD4 T Cell Response in HIV-1 Infection. *Journal Immunol*, v.12, n.6, p.1- 26. doi:10.1371/journal.ppat.1005663.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*. v.39, p: 2971-74, 2001.

MARCOS-ARIAS, C. et al. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. v.54, n.4, p.10-6, 2011.

MUSHI, M. F et al. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals :10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa. *Journal of Oral Microbiology*, v. 9, n. 1, 2017.

OSEI-YEBOAH, J. et al. Quality of Life of People Living with HIV/AIDS in the Ho Municipality, Ghana: A Cross-Sectional Study. *AIDS Research and Treatment*, p. 1–7, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2017/6806951> > Acesso em: 22 de jun de 2018.

PÉREZ-OLMOS, I. et al. Percepção da qualidade do sono em jovens. *Revista. Ciencia. Salud*, v. 10, n. 1: p 7- 19. 2012.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Med. Mycol.*, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.32, n.10, p.15-28, 2011.

SAMARANAYAKE ,L.P.; RAESIDE, J.M.; MCFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*. v.22 n.3 p. 201-7, 1984.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Arzteblatt international*, v. 106, n. 51–52, p. 837–42, 2009.

SIDRIM, J.J.C., et al. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase

activity. *Veterinary Microbiology* 145, p.324–328, 2010.

STUEHLER, C. et al. Immune recovery in HIV-infected patients after *Candida* esophagitis is impaired despite long-term antiretroviral therapy. *Aids*, v. 30, n. 12, p. 1923–1933, 2016.

TADIELLO, J.P. Atividade hemolítica de espécies de *Candida* não-albicans isoladas a partir de infecções orais. IV Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG). 2016.

TUFIK S. *Medicina e biologia do sono*. Barueri (SP): Manole; 2008.

UCHÔA, L.R.A. et al. Poor Sleep Quality in Persons Living with HIV : a Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Nursing and Health Sciences*, v. 4, n. 2, p. 26–33, 2018.

VARELA, M.N.T.; MACÊDO, D.P.C. Atividade proteásica e hemolítica dos agentes de candidemia nosocomial como fatores de patogenicidade. 2016.