

GUILHERME LUIS PINHO GERLA

**Produção de moléculas secretadas por *Candida spp.*
isoladas do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*).**



**Monografia apresentada ao
Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JANEIRO / 2023**

Trabalho realizado no Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação do Professor Dr. André Luis Souza dos Santos e coorientação do doutorando Antonio Lima Braga.

CIP - Catalogação na Publicação

G956p Gerla, Guilherme
Produção de moléculas secretadas por *Candida* spp.
isoladas do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*).
/ Guilherme Gerla. -- Rio de Janeiro, 2023.
48 f.

Orientador: André Luis Souza dos Santos.
Coorientador: Antônio Lima Braga.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. *Candida* spp.. 2. Moléculas secretadas. 3.
Fatores de virulência. 4. Enzimas hidrolíticas. 5.
Aquacultura. I. Souza dos Santos, André Luis,
orient. II. Lima Braga, Antônio, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Guilherme Luis Pinho Gerla
DRE: 115092615

BANCA EXAMINADORA: Prof. Fabiano Ferreira Dutra (Presidente)
Prof. Leonardo Nimrichter
Profa. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro
Dra. Livia de Souza Ramos (Suplente)

**Título da Monografia: “Produção de moléculas secretadas por *Candida* spp.
isoladas do peixe tambaqui (*Colossoma macroporum*)”**

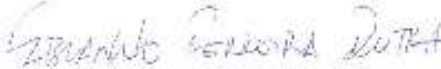
Local: Sala virtual <https://meet.google.com/wvd-vavp-ezd>

Data e hora de início: 30 de janeiro de 2023 às 13:30h


Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2023.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9</u>	Prof. Fabiano Ferreira Dutra
<u>9</u>	Prof. Leonardo Nimrichter
<u>9</u>	Profa. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro
	Dra. Livia de Souza Ramos

Presidente da banca 

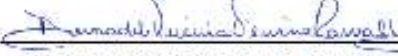
Prof. Fabiano Ferreira Dutra

Aluno: 

Guilherme Luis Pinho Gerla

Orientador: 

Prof. André Luis Souza dos Santos / Coorientador: M.Sc. Antonio Lima Braga

Coordenador de TCC 

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a meu orientador André por sua paciência e didática neste período conturbado de minha vida e por me aceitar para fazer parte de seu grupo de trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório pelo apoio e risadas que demos neste ano que passei trabalhando com eles.

A meu coorientador Tonny pela ajuda na organização de experimentos e pela amizade que fizemos neste período.

À Lucieri, Livia, Thais, Luca e Iuri pela ajuda com o lado experimental, sempre tirando minhas dúvidas quando me apareceram.

À minha mãe Andrea pelo apoio e ajuda, aquele empurrão extra que eu precisei para fechar o ciclo.

E por fim, a UFRJ, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro à esta pesquisa.

RESUMO

GUILHERME LUIS PINHO GERLA

PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SECRETADAS POR *CANDIDA* SPP. ISOLADAS DO PEIXE TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*)

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Coorientador: Antonio Lima Braga

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O gênero *Candida* é um grupo de microrganismos classificados como fungos leveduriformes, que colonizam diversos ecossistemas e organismos. São fungos normalmente inócuos, mas que vêm ganhando atenção desde o início do milênio, pois são agentes etiológicos de infecções oportunistas emergentes em hospedeiros com algum grau de imunocomprometimento. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe de grande relevância econômica para a região norte e nordeste do país, servindo como fonte de alimentação para a população. Este fato o leva a ser amplamente criado na aquicultura em condições nem sempre ideais. A má manipulação, transporte e venda deste pescado pode levar à contaminação, tanto dos criadores quanto dos consumidores, por espécies de *Candida* que comumente colonizam o tambaqui. O objetivo do trabalho foi identificar e quantificar moléculas secretadas por *Candida* spp., que têm diversos papéis na fisiologia e virulência destas espécies fúngicas durante o processo infeccioso. Desta forma, foram obtidos 38 isolados de diferentes sítios anatômicos de 10 peixes (10 coletados da região de esôfago e estômago, 19 coletados do intestino anterior e 9 coletados do intestino posterior). Os isolados foram inoculados em meio CHROMagar *Candida* para a identificação presuntiva das espécies. Em seguida, avaliou-se a produção de sete tipos de moléculas secretadas: fitases, fosfatases, esterases, aspártico-peptidases, metalo/serina peptidases, sideróforos e hemolisinas. A produção das moléculas secretadas foi avaliada 7 dias após a inoculação dos isolados fúngicos em meio de cultura sólido contendo o substrato para cada uma das moléculas estudadas. O método de identificação utilizado neste estudo não foi capaz de elucidar a identidade dos

isolados fúngicos de nossa coleção, uma vez que todos os isolados resultaram em uma coloração creme quando inoculados em meio CHROMagar Candida; exceção a um isolado que resultou na cor lilás/rosada. Em relação a secreção de moléculas associadas à virulência, nossos resultados demonstraram que os isolados de *Candida* spp. recuperadas do peixe tambaqui não apresentaram a capacidade de secretar esterases e fosfolipases sob as condições empregadas nos experimentos. Apenas 12 dos 38 (31,6%) isolados fúngicos secretaram fitases, com maior produção detectada entre os isolados do esôfago/estômago e intestino anterior quando comparado aos isolados do intestino posterior. Em relação às metalo/serina peptidases, 35 dos 38 (92,1%) isolados apresentaram atividade destas classes enzimáticas, sendo a produção maior nos fungos recuperados das regiões do intestino anterior e posterior em relação ao esôfago/estômago. Ainda em relação às peptidases, foi detectada a produção de aspártico peptidases em 21 dos 38 (55,3%) isolados, sem diferenças significativas entre as regiões anatômicas estudadas. Todos os isolados apresentaram secreção de hemolisinas, novamente sem diferenças significativas entre os fungos isolados de diferentes regiões anatômicas dos peixes. No caso dos sideróforos, foi detectada atividade em 20 dos 38 (52,6%) isolados, com a maior expressão nos isolados recuperados do esôfago/estômago. A identificação dos isolados fúngicos em nível de espécie, através da amplificação do gene *ITS*, será utilizada para comparar nossos resultados com a literatura, particularmente com isolados de *Candida* de origem ambiental.

Palavras-chave: *Candida* spp., Moléculas secretadas, Fatores de virulência, Enzimas hidrolíticas, Aquacultura.

ABSTRACT

GUILHERME LUIS PINHO GERLA

SECRETED MOLECULES PRODUCED BY *CANDIDA* SPP. ISOLATED FROM TAMBAQUI FISH (*COLOSSOMA MACROPOMUM*)

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Coorientador: Antonio Lima Braga

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The genus *Candida* is a group of microorganisms classified as yeast-like fungi, which colonize various ecosystems and organisms. They are normally innocuous fungi, but they have been gaining attention since the beginning of the millennium, as they are etiological agents of emerging opportunistic infections in hosts with some degree of immunocompromise. The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a fish of great economic importance for the north and northeast of the country, serving as a source of food for the population. Adult specimens from artificial breeding have an average weight of 1.5 to 2 kg and are an important part of the local diet. This fact leads to it being widely bred in fish farming in conditions that are not always ideal. Poor handling, transport and sale of this fish can lead to contamination, both by breeders and consumers, by *Candida* species that commonly colonize tambaqui. In the present work, we aim to identify and quantify molecules secreted by *Candida* spp., which play different roles in the physiology and virulence of these fungal species during the infectious process. In this way, 38 isolates were obtained from different anatomical sites of 10 fishes (10 collected from the esophagus/stomach region, 19 collected from the foregut and 9 collected from the hindgut). The isolates were inoculated in CHROMagar Candida medium for the presumptive identification of the species. Then, the production of seven types of secreted molecules was evaluated: phytases, phosphatases, esterases, aspartic peptidases, metallo/serine peptidases, siderophores and hemolysins. The production of secreted molecules was evaluated after 7 days of incubation of fungal isolates onto solid culture media containing the substrate for each of the studied molecules. The identification method used in this study was not able to elucidate the identity of

the fungal isolates in our collection, since all isolates resulted in a cream color when inoculated in CHROMagar medium, except for one isolate that resulted in lilac/pink color. Regarding the secretion of molecules associated with virulence, our results demonstrated that *Candida* spp. recovered from tambaqui fishes did not show the ability to secrete esterases and phospholipases under the employed experimental conditions. Only 12 of the 38 (31.6%) fungal isolates secreted phytases, with greater production detected among isolates from the esophagus/stomach and foregut when compared to isolates from the hindgut. Regarding metallo/serine peptidases, 35 of the 38 (92.1%) isolates showed activity of these enzymatic classes, with higher production in fungi recovered from the foregut and hindgut regions in relation to the esophagus/stomach. Still regarding peptidases, the production of aspartic peptidases was detected in 21 of the 38 (55.3%) isolates, with no significant differences between the anatomical regions evaluated. All isolates showed secretion of hemolysins, again without significant differences between fungi isolated from different anatomical regions of fishes. In the case of siderophores, activity was detected in 20 of the 38 (52.6%) isolates, with the highest expression in isolates recovered from the esophagus/stomach. The identification of fungal isolates at the species level, through amplification of the *ITS* gene, will be used to compare our results with the literature, particularly with *Candida* isolates of environmental origin.

Key-words: *Candida* spp., secreted molecules, Virulence factors, Hydrolytic Enzymes, Aquaculture.

RESUMO PARA LEIGOS

GUILHERME LUIS PINHO GERLA

PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SECRETADAS POR *CANDIDA* SPP. ISOLADAS DO PEIXE TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*)

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Coorientador: Antonio Lima Braga

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O grupo de fungos conhecido como *Candida* coloniza diversos ecossistemas e seres vivos. Normalmente são inofensivos, mas vêm ganhando atenção desde o início do milênio, pois podem causar doenças em indivíduos mais vulneráveis como idosos e pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva. O tambaqui é um peixe importante para a economia e alimentação das regiões norte e nordeste. Porém, a má manipulação, transporte e venda deste peixe pode levar à contaminação, tanto dos trabalhadores como das pessoas que comem o peixe, por fungos como as espécies de *Candida*, que podem ser encontrados na água, na comida e no próprio peixe. Neste trabalho, nosso objetivo foi descobrir quais espécies de *Candida* poderiam ser encontradas nos tambaquis criados no Piauí e medir a produção de moléculas por esses fungos, que os auxiliam a infectar os animais. Estas moléculas facilitam a infecção pelos fungos ao permitir que eles invadam tecidos e capturem os nutrientes do seu hospedeiro. Ao medir esta produção, podemos entender melhor como funciona uma infecção por essas espécies de *Candida* caso alguma venha a contaminar um ser humano através do consumo do tambaqui. Coletamos 38 amostras de *Candida* de diferentes partes do estômago, esôfago e intestino dos peixes e avaliamos a produção de sete grupos dessas moléculas, cada um com um papel diferente na infecção causada pela *Candida*. Concluímos que os isolados de *Candida* não produziram lipases, um grupo de moléculas importante para atacar a parede das células, mas produzem hemolisinas, que são capazes de quebrar células vermelhas do sangue, e sideróforos, que podem capturar ferro que é um elemento necessário ao crescimento fúngico. Também

detectamos nos isolados fúngicos a produção de fitases, que quebram fitato, uma fonte de fósforo para *Candida*, e peptidases, que também podem atacar as células quebrando proteínas relevantes do hospedeiro. Nosso estudo vai ajudar a entender melhor como essas espécies de *Candida* podem infectar o peixe e como este fungo interage com o ambiente e os peixes, e assim poderemos evitar que as mesmas possam contaminar seres humanos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conceito *One Health* aplicado à aquacultura, mais especificamente ao cultivo de algas marinhas. Os efeitos causados são indicados pelas setas verdes (baixo impacto) e vermelhas (alto impacto). As setas para fora representam os impactos negativos, enquanto as para o centro representam os benefícios para cada componente (Bizzaro, Vatland e Pampanin., 2022).

Figura 2 – Esquema de adesão de *Candida* na mucosa. Os primeiros eventos na patogênese da candidíase são retratados na superfície de uma mucosa. Uma célula de *C. albicans* é mostrada germinando (esquerda). Adesinas (Als1p, Als5p, Hwp1p, Int1p) e enzimas (Saps e Plb1p) promovem a aderência às células do hospedeiro. Na direita, é mostrada a fagocitose induzida da levedura por uma célula da mucosa. As enzimas Sap são peptidases, enquanto a Plb1p é uma fosfolipase (Calderone e Fonzi, 2001).

Figura 3 – Mecanismos de captura de ferro de *Candida* spp. São mostrados os principais fatores que mediam as três vias conhecidas de absorção de ferro de alta afinidade: absorção redutora de ferro, absorção de sideróforo-ferro e absorção de hemoglobina-ferro (Chen *et al.*, 2011).

Figura 4 – Atividade das fitases sobre os complexos de fitato, libertando o inositol para ser absorvido pelas células de microrganismos (Sharma *et al.*, 2020).

Figura 5 – Placa de meio CHROMagar com o isolado p10 (p713), que apresentou uma coloração lilás.

Figura 6 – Detecção da atividade de metalo/serina peptidases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos do peixe tambaqui após 7 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

Figura 7 – Média da produção de metalo/serina peptidases entre os isolados de peixe tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolo (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ($P < 0,05$). O símbolo (**) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ($P < 0,005$). EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 8 – Detecção da atividade de aspártico-peptidases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos do peixe tambaqui após 7 dias de incubação em meio YCB-BSA. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

Figura 9 – Média da produção de aspártico-peptidases entre os isolados de peixe tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 10 – Detecção da atividade de fitases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos do peixe tambaqui após 7 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

Figura 11 – Média da produção de fitases entre os isolados de peixe tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolos (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de $P < 0,01$ e $P < 0,005$, respectivamente. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 12 – Detecção da atividade de hemolisinas nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos do peixe tambaqui após 5 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 13 – Média da produção de hemolisinas entre os isolados de peixe tambaqui no quinto dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 14 – Detecção da atividade de sideróforos nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos do peixe tambaqui após 5 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

Figura 15 – Média da produção de sideróforos entre os isolados de peixe tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolo (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P < 0,05$). EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de isolados com atividade enzimática de proteases (Pz), fosfolipases (PLz) e esterase (Ez) na literatura.

Tabela 2 – Identificação dos isolados utilizados e região anatômica do peixe de onde foram isoladas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: albumina de soro bovino (bovine serum albumin)

DP: desvio-padrão

EE: esôfago/estômago

HIV: vírus da imunodeficiência humana (human immunodeficiency virus)

IA: intestino anterior

IP: intestino posterior

SAP: aspartil proteinases secretadas (secreted aspartyl proteinases)

YCB: base de carbono de leveduras (yeast carbon base)

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
RESUMO PARA LEIGOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Espécies de <i>Candida</i> responsáveis por infecções em seres humanos	1
1.2. Espécies de <i>Candida</i> e a aquacultura	3
1.3. <i>One Health</i> no contexto de aquacultura	4
1.4. <i>Colossoma macropomum</i>	6
1.5. Secreção de moléculas.....	6
1.5.1. Peptidases	9
1.5.2. Hemolisinas e sideróforos.....	10
1.5.3. Lipases	11
1.5.4. Fitases.....	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.2. Identificação Presuntiva	15
4.2.1. Cultivo em meio CHROMagar <i>Candida</i>	15
4.3. Avaliação do perfil de moléculas secretadas	15
4.3.1. Teste para produção de aspártico-peptidases.....	15
4.3.2. Teste para a produção de metalo/serino peptidases	16
4.3.3. Teste para a produção de fitase.....	16
4.3.4. Teste para a produção de fosfolipase	16
4.3.5. Teste para a produção de esterase	16
4.3.6. Teste para a produção de sideróforos	16
4.3.7. Teste para a produção de hemolisinas	17
4.4. Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS	17
5.1 Identificação presuntiva dos isolados fúngicos por CHROMagar <i>Candida</i>	17
5.4. Aspártico peptidases	19
5.6 Fitases.....	20

5.7 Hemolisinas	21
5.8 Sideróforos	22
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é um grupo de microrganismos classificados como fungos leveduriformes, que colonizam diversos ecossistemas e organismos (Skinner e Fletcher, 1960). O mais conhecido deste grupo, a espécie *Candida albicans*, é normalmente inócuo e vem ganhando atenção desde o início do milênio, assim como diversos membros deste gênero, sendo causadores de infecções oportunistas emergentes (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Algumas espécies, como *C. albicans*, estão presentes na microbiota humana em superfície de mucosas, sendo comumente encontradas na pele, trato respiratório, gastrointestinal e urogenital (Dadar *et al.*, 2018). Infecções por estas espécies são associadas com hospitalizações de longa duração e uso prolongado de antimicrobianos (Tong e Tang, 2017). Estes fungos podem colonizar cateteres em unidades hospitalares e causar infecções severas em grupos de indivíduos imunocomprometidos, como pacientes em unidades de tratamento intensivo e indivíduos acometidos com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tuberculose (Ramesh *et al.*, 2011), podendo se instalar na pele, nas mucosas e, em sua forma mais grave, invadir os tecidos e adentrar a corrente sanguínea, se espalhando pelo corpo do hospedeiro, causando uma infecção sistêmica descrita como candidemia, cuja mortalidade pode variar de 50% a 100% em grupos de risco (Kumar e Jha, 2017). Atualmente, mortes associadas a candidíase invasiva chegam a mais de 350 mil por ano, reforçando a urgência para entender seus mecanismos de virulência (Dobiáš e Havlíček, 2021).

1.1. Espécies de *Candida* responsáveis por infecções em seres humanos

Várias espécies de *Candida* são responsáveis por diferentes tipos de infecções em seres humanos. Há 150 espécies documentadas de *Candida* com 7 espécies (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitanae* e *C. guilliermondii*) sendo responsáveis por 95% das infecções em humanos (Sá *et al.*, 2020). Quatro espécies, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* oferecem risco para neonatos e transplantados, enquanto *C. tropicalis* vem sendo associada à neutropenia (Butler *et al.*, 2009). A identificação da espécie de *Candida* responsável pela infecção é de especial importância devido ao fato que espécies diferentes podem possuir perfis de resistência diferentes aos antifúngicos disponíveis. No entanto, a ocorrência das várias espécies de *Candida* não pode ser estritamente associada ao ambiente hospitalar, e pode ser encontrada em alimentos, solo, água e na microbiota humana e de animais (Dadar *et al.*, 2018). Por exemplo, Cupozak-Pinheiro *et al.* (2022) realizaram

identificação de espécies de *Candida* encontradas em amostras de água coletada em lençóis freáticos de três municípios brasileiros, utilizados para consumo da população, sendo *C. parapsilosis* a espécie isolada mais encontrada, o que pode levar à contaminação da fauna aquática silvestre e domesticada para fins comerciais, como a aquicultura.

Candida spp. são membros importantes da microbiota humana, com capacidade de impactar o hospedeiro, adaptando-se a mudanças em suas condições fisiológicas. De forma assintomática, coloniza numerosos locais do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, trato geniturinário e pele de indivíduos saudáveis (Kumamoto, Gresnigt e Hube, 2020). As espécies de *Candida* podem sofrer variações geográficas. Por exemplo, enquanto a maioria dos seres humanos nas sociedades ocidentais apresentam colonização intestinal por *C. albicans* (Hallen-Adams e Suhr, 2017; Nash *et al.*, 2017), membros de populações indígenas, como os residentes da floresta amazônica, apresentam taxas significativamente mais baixas de *C. albicans*, sendo colonizados por outras espécies de *Candida* não-*albicans* (Angebault *et al.*, 2013). Esses dados sugerem que o ambiente e o estilo de vida (dieta, exposição a medicamentos modernos, como antimicrobianos) podem desempenhar um papel nas disparidades na colonização intestinal.

Espécies de *Candida* podem comprometer o tratamento hospitalar de indivíduos imunossuprimidos, como pacientes em unidades de tratamento intensivo, indivíduos acometidos com HIV, tuberculose e transplantados. Mais recentemente, Tsai *et al.* (2022) associaram a incidência de COVID-19 à candidíase, resultando em consequências graves sobre os pacientes hospitalizados com COVID-19, sendo a condição mais alarmante o aumento da incidência de resistência a várias drogas, especialmente *Candida auris*, em diversas partes do mundo.

A formação de biofilme fornece às espécies de *Candida* mecanismos adicionais de resistência e tolerância. Trabalhos recentes mostraram que essas espécies liberam vesículas extracelulares durante a formação do biofilme que transportam componentes da matriz extracelular, incluindo glucana e manana (Mitchel *et al.*, 2015; Zarnowski *et al.*, 2021). As proteínas existentes nessas vesículas demonstraram desempenhar papéis importantes no sequestro de drogas através do complexo glucano-manana da matriz extracelular, indicando contribuição relevante para a tolerância a drogas em biofilmes de *Candida* (Kaur e Nobile, 2022).

1.2. Espécies de *Candida* e a aquacultura

A aquacultura é o setor de produção de alimentos de mais rápido crescimento no mundo nas últimas décadas, atendendo ao aumento da demanda de proteína animal. O crescimento de 18% ao ano desta atividade econômica se deve à diversificação e intensificação da criação das espécies domesticadas (Cabello e Godfrey, 2019). O Brasil possui condições ambientais e geográficas favoráveis para o desenvolvimento da aquacultura, tendo sido observados aumentos na produção de diversos organismos aquáticos no país nos últimos anos. Esse crescimento ocorreu principalmente devido ao avanço das pesquisas e adaptações de pacotes tecnológicos para o crescimento de espécies, assim como na implementação de políticas públicas para a área (Mesquita, Calixto e Takata, 2021). Entretanto, a aquacultura traz riscos de aparecimento de doenças novas e emergentes que podem não só contaminar o pescado como também afetar populações locais e consumidores. Por exemplo, existem relatos de patógenos ambientais que podem causar prejuízos à aquacultura, levando à alta mortalidade do pescado, o que impulsiona o uso de produtos químicos e antibióticos para conter estes surtos, muitas vezes de forma incorreta, induzindo o aparecimento de formas resistentes com potencial patogênico a humanos (Cabello e Godfrey, 2019; Couto *et al.*, 2021).

Há pouca literatura sobre espécies de *Candida* em aquacultura, havendo citações de uso de várias espécies para alimentação de crustáceos e peixes carnívoros, devido ao seu alto conteúdo proteico e menor custo. Tavares-Dias *et al.* (2013) mencionam algumas espécies de fungos capazes de causar infecções que representam fatores limitantes para o cultivo de tambaqui. No entanto, não são citadas espécies de *Candida*, e os fungos que costumam acometer o tambaqui são *Saprolegnia* spp. e *Achlya* spp., cujo controle é feito pelo uso de sulfato de cobre.

Lee e Kim (2000) descreveram a produção de *Candida utilis* através da fermentação aeróbica para alimentação em aquacultura. Dentre as vantagens mencionadas, os autores citam a alta concentração de aminoácidos da *C. utilis* e ainda a presença de vitaminas e sais minerais, que promovem o aumento da resistência a várias doenças. Øvertland *et al.* (2013) e Hansen *et al.* (2019) avaliaram *C. utilis* como fonte de proteínas em dietas para salmão, medindo crescimento, digestibilidade, retenção de nutrientes em sangue e órgãos internos, demonstrando que *C. utilis* se constituía em uma boa fonte de proteínas. Além de *C. utilis*, outras espécies de *Candida* foram propostas como fonte de proteínas na aquacultura. Santos *et al.* (2017) propuseram o uso de *C. lipolytica*, concluindo que o biossurfactante formado durante sua produção não era tóxico para bivalves, microcrustáceos ou sementes vegetais. Além disso,

sugeriram possíveis usos do biossurfactante para degradação de derrames de óleo em água do mar. O uso de *Candida sake* foi proposto para alimentação e imunostimulação de uma espécie de crustáceo, o *Fenneropenaeus indicus* (Sajeevan, Philip e Singh, 2006), pois segundo os autores, o principal componente (aproximadamente 50-60%) da parede celular da levedura, a β -1-3-glucana, é capaz de estimular a função imune de crustáceos. Assim, observaram que 10% de *C. sake* na dieta provocava uma melhora na resposta imune nesses animais, que já podia ser constatado no segundo e terceiro dia após um desafio com um vírus específico que costuma acometê-los. Similarmente, Babu *et al.* (2013) identificaram o potencial de uso de *Candida aquatextoris* como imunostimulante para outra espécie de crustáceo (*Penaeus monodon*), comprovando uma melhor proteção contra um vírus específico no intervalo de alimentação de 7 dias.

Há ainda relatos de outros usos de espécies de *Candida* na aquacultura. Gao *et al.* (2019) propuseram o uso combinado de uma cepa de *C. tropicalis* e *Pseudomonas stutzeri* para remoção de nitrogênio em aquacultura. Enquanto *C. tropicalis* assimila amplamente o nitrogênio inorgânico, sintetizando substâncias poliméricas extracelulares, absorvendo substâncias químicas nocivas e agregando outros microrganismos em forma de partículas grandes, *P. stutzeri* remove o nitrogênio principalmente por desnitrificação.

O uso destas diversas espécies apresenta potencial para o desenvolvimento de novas técnicas de otimização de produção, mas não descarta o potencial de contaminação humana por patógenos que possam contaminar estes peixes. De fato, várias espécies de pescado são comumente infectadas por parasitos com potencial patogênico em humanos, e embora peixes de criação sejam mais seguros para consumo em relação às alternativas devido ao controle do ambiente de criação, ainda apresentam uma via de contaminação possível para humanos. (Lopez-Verdejo *et al.*, 2022).

1.3. One Health no contexto de aquacultura

O estudo das espécies ambientais de *Candida* está de acordo com os princípios da iniciativa *One Health* da Organização Mundial da Saúde (OMS), visando integrar o conhecimento médico, veterinário e ambiental com o intuito de prevenir doenças que podem ser causadas pela interação entre animais, ecossistemas e o ser humano. A importância desse conceito foi destacada pela OMS e pelo G20, tendo sido incluída nos Objetivos de Desenvolvimento

Sustentável (ODS) das Nações Unidas (Hambrey, 2017). Bizzaro, Vatland e Pampanin (2022) discutiram os benefícios da aplicação do conceito *One Health* para a aquicultura, mais especificamente o cultivo de algas marinhas, destacando a variedade de efeitos possíveis (Figura 1). Os autores ponderam que, mesmo com benefícios em termos de saúde pública, econômicos e sociais, o rápido crescimento dessa indústria pode levar a consequências ecológicas inesperadas. Sendo assim, nessa expansão, os aspectos ecológicos e sociais devem ser considerados para equilibrar o crescimento econômico e o meio ambiente. Para atingir esse objetivo, é necessária uma abordagem holística, na qual diferentes disciplinas, incluindo medicina, epidemiologia, agricultura, ecologia, química, ciências ambientais e biologia, trabalhem juntas. Dessa forma, a implementação da abordagem *One Health*, como um princípio no qual os resultados de saúde humana, animal e ambiental são totalmente compreendidos e considerados, levaria ao desenvolvimento de ferramentas práticas úteis para enfrentar amplos desafios sociais. Portanto, a abordagem *One Health* pode se tornar a abordagem preferível na qual a indústria de produção de alimentos pode ser projetada e avaliada, evidências científicas podem ser reunidas a políticas e legislações aplicadas. No caso da aquicultura, o conceito *One Health* tem sido usado principalmente para descrever o impacto de patógenos no meio ambiente, na vida selvagem e nas condições humanas, o que permitirá a definição de métricas que a indústria deverá seguir para garantir sua sustentabilidade. A implementação dessa estrutura na aquicultura ajudaria a determinar condições para orientação de pesquisas, políticas e mudanças legislativas, sendo uma das maiores preocupações da *One Health* a resistência antimicrobiana, uma das mais sérias ameaças globais do século 21 à saúde humana (Santos e Ramos, 2018).

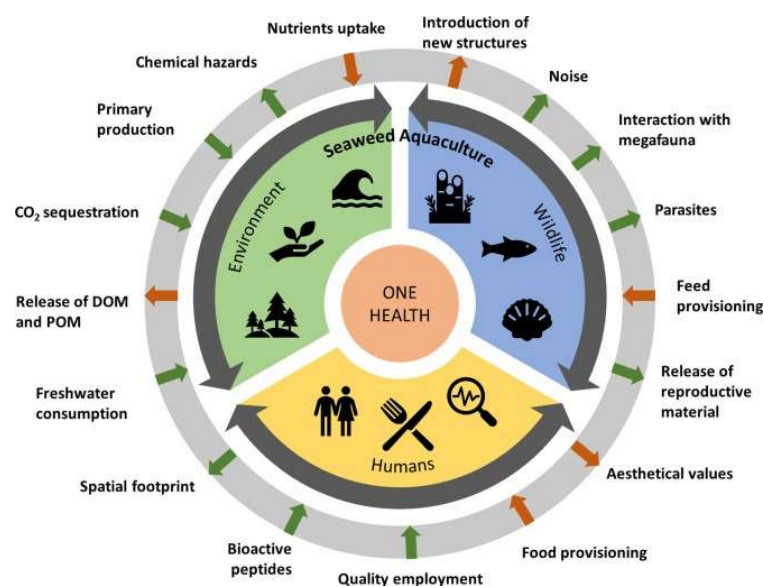


Figura 1 – Conceito *One Health* aplicado à aquacultura, mais especificamente ao cultivo de algas marinhas. Os efeitos causados são indicados pelas setas verdes (baixo impacto) e vermelhas (alto impacto). As setas para fora representam os impactos negativos, enquanto as para o centro representam os benefícios para cada componente (Bizzaro, Vatland e Pampanin., 2022).

1.4. *Colossoma macropomum*

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe omnívoro bem adaptado a climas quentes, com baixa sensibilidade para baixa oxigenação, pH e temperatura, o que faz dele atraente para a prática da aquacultura (Morante *et al*, 2021), com grande relevância econômica para a região norte e nordeste como fonte de alimentação para a população, sendo a segunda espécie de peixe mais cultivada no Brasil (dos Santos, 2022). Exemplares adultos advindos de criadouros artificiais têm um peso médio de 1,5 a 2 kg e são parte importante da dieta local, com o consumo *per capita* chegando a 44 kg de peixe/ano (Rocha-Aride, Roubach e Val, 2004). O consumo no resto do país em comparação é relativamente pequeno (3,5kg/ano por habitante), mas tem potencial para crescimento (PEIXEBR, 2022).

O tambaqui pode ser criado de forma extensiva, semi-intensiva e intensiva. A forma extensiva envolve a criação dos peixes em lagos e reservatórios, em monocultura ou policultura com outras espécies de pescado utilizando alimentação orgânica, com a coleta ocorrendo aproximadamente 2 anos depois da introdução do peixe. As formas semi-intensivas e intensivas do cultivo ocorrem em tanques de menor tamanho com maior densidade de pescado, com alimentação enriquecida e ração comercial, com a coleta ocorrendo aproximadamente 15 meses após o início da cultura (Campos-Baca e Kohler, 2005). Entretanto, as condições de criação deste pescado não são sempre ideais. A má manipulação, transporte e venda deste pescado pode levar à contaminação, tanto dos criadores como dos consumidores, por diversas espécies de fungos que comumente colonizam o tambaqui, além de causar danos em diversos tecidos e órgãos dos peixes através da destruição de tecidos e produção de toxinas (Nunes *et al.*, 2019).

1.5. Secreção de moléculas

Ao colonizar um hospedeiro susceptível, espécies do gênero *Candida* se utilizam de um arsenal de moléculas secretadas com diferentes funções na fisiologia e progressão da infecção (Chaffin *et al*, 1998). Suas funções variam desde a invasão de tecidos através da hidrólise de membranas celulares no caso de lipases e peptidases até a captura de nutrientes, com ou sem danos celular no caso de hemolisinas e fitases, respectivamente.

Existem discordâncias quanto ao que pode ser definido como um fator de virulência no gênero *Candida*, com definições abrangendo: i) características necessárias para o estabelecimento de uma infecção, ii) fatores que interagem diretamente com as células do hospedeiro e iii) componente do patógeno que causa danos ao hospedeiro (Yang, 2003). Enquanto hemolisinas e fosfolipases auxiliam na captura de nutrientes e invasão celular ao causar dano diretamente às células do hospedeiro, entrando nestas definições de fator de virulência, outras moléculas como as fitases não interagem com o hospedeiro, realizando apenas a captura de fitato no ambiente extracelular, ainda que auxiliem na progressão da infecção ao prover a colônia com fosfato. É importante lembrar que a secreção destas moléculas não é universal, pois ocorrem variações nos níveis de secreção e em diversos casos, espécies abrem mão completamente de secretar alguns fatores extracelulares.

Há vários exemplos na literatura da variação da atividade enzimática de diversos isolados de *Candida* spp. coletados ao redor do mundo de casos clínicos e isolados ambientais. A tabela 1 mostra alguns exemplos de dados coletados de diversos estudos de atividade de peptidases, fosfolipases e esterases de diferentes espécies de *Candida*. É notável a variação entre a mesma espécie dependendo do sítio de coleta. Ramos *et al.* (2015) relataram que isolados clínicos cutâneos de *C. famata* foram os produtores de peptidase mais potentes, enfatizando que algumas cepas clínicas de *C. ciferri* e *C. haemulonii* eram capazes de secretar aspártico-peptidases. Apenas isolados de *C. albicans* (100%) e *C. famata* (40%) mostraram atividade para fosfolipase, enquanto as demais espécies (*C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) não mostraram atividade.

Kantarcioglu e Yücel (2002), em amostras coletadas de vários tecidos (cavidade oral, trato respiratório, urogenital, sangue), mostraram que entre 71% e 92% de todas as cepas examinadas de *C. albicans* eram positivas para aspártico-peptidases, a depender do tecido examinado: cavidade oral (17/22 = 77,3%), trato respiratório (37/46 = 80,4%) e sistema urogenital (21/23 = 91,3%). Curiosamente, apenas isolados de sangue não apresentavam essas enzimas (0/4 = 0%). Similarmente, De Bernardis *et al.* (1999) relataram que todos os isolados cutâneos de *C. parapsilosis* apresentaram secreção de aspártico-peptidases com elevada atividade, enquanto nenhum isolado de sangue apresentou a secreção destas enzimas. Kantarcioglu e Yücel (2002) mostraram que entre 59% e 70% dos isolados de *C. albicans* da cavidade oral, trato respiratório e urogenital mostraram-se positivos para fosfolipases, enquanto apenas 25% dos isolados de sangue foram positivos para fosfolipases. Pakshir *et al.* (2013) estudaram isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis* provenientes da cavidade oral. A maioria dos isolados de *C. albicans*

mostrou-se positivo para fosfolipases e esterase, 91,7% e 87,5%, respectivamente, enquanto apenas 26,1% e 46,5% dos isolados de *C. parapsilosis* mostraram-se positivos para fosfolipases e esterase.

Tabela 1 – Porcentual de isolados com atividade enzimática de peptidases (Pz), fosfolipases (PLz) e esterase (Ez) na literatura. N representa o número de isolados.

Espécie	Sítio de isolamento	N	Pz, n (%)	PLz, n (%)	Ez, n (%)	Referência
<i>C. parapsilosis</i>	pele	12	100,0	n.d. ^a	n.d.	De Bernardis <i>et al.</i> , 1999
<i>C. parapsilosis</i>	sangue	9	0,0	n.d.	n.d.	De Bernardis <i>et al.</i> , 1999
<i>C. albicans</i>	cavidade oral	22	77,3	59,1	n.d.	Kantarcioglu e Yücel, 2002
<i>C. albicans</i>	trato respiratório	46	80,4	69,6	n.d.	Kantarcioglu e Yücel, 2002
<i>C. albicans</i>	urogenital	23	91,3	65,2	n.d.	Kantarcioglu e Yücel, 2002
<i>C. albicans</i>	sangue	4	0,0	25,0	n.d.	Kantarcioglu e Yücel, 2002
<i>C. albicans</i>	cavidade oral	24	n.d.	91,7	87,5	Pakshir <i>et al.</i> , 2013
<i>C. parapsilosis</i>	cavidade oral	46	n.d.	26,1	43,5	Pakshir <i>et al.</i> , 2013
<i>C. albicans</i>	cutâneo ^b	9	100,0	100,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. cifferri</i>	cutâneo ^b	5	20,0	40,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. famata</i>	cutâneo ^b	11	63,6	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. guilliermondii</i>	cutâneo ^b	4	0,0	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015

<i>C. haemulonii</i>	cutâneo ^b	7	14,3	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. lipolytica</i>	cutâneo ^b	3	0,0	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. parapsilosis</i>	cutâneo ^b	16	93,8	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. tropicalis</i>	cutâneo ^b	3	66,7	0,0	n.d.	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<i>C. krusei</i>	lixiviação de aterro	18	100,0	61,1	55,6	Amani <i>et al.</i> , 2018
<i>C. tropicalis</i>	lixiviação de aterro	16	62,5	68,8	75,0	Amani <i>et al.</i> , 2018
<i>C. lusitaniae</i>	lixiviação de aterro	3	100,0	33,3	0,0	Amani <i>et al.</i> , 2018
<i>C. robusta</i>	lixiviação de aterro	2	100,0	100,0	50,0	Amani <i>et al.</i> , 2018
<i>C. parapsilosis</i>	Água	13	n.d.	100,0	100,0	Cupozak-Pinheiro <i>et al.</i> , 2022
<i>C. glabrata</i>	Água	7	n.d.	0,0	0,0	Cupozak-Pinheiro <i>et al.</i> , 2022

^a n.d. – não disponível

^bcutâneo – Unhas dos pés, unhas das mãos, sola dos pés, pele.

1.5.1. Peptidases

Aspártico peptidases são enzimas comuns em diversos organismos estudados pela biologia, com 354 representantes diferentes encontrados em animais, plantas e fungos. São proteínas normalmente compostas por dois domínios simétricos com um sítio ativo encontrado entre eles (Dunn, 2013). Em *Candida*, estas enzimas são chamadas de SAPs (*secreted aspartyl proteinases*), com 10 membros desta família identificados em *C. albicans*, e outras enzimas similares identificadas em *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A produção destas enzimas está associada à virulência de espécies de *Candida* devido ao seu papel na destruição e alteração das células do hospedeiro para facilitar a adesão e a disponibilização de nutrientes,

como mostrado na figura 2, e a evasão do sistema imune e de agentes microbicidas através da destruição de moléculas nocivas ao fungo (Naglik, Challacombe e Hube, 2003; De Luca *et al.*, 2012). Estudos apontam que cepas isoladas de pacientes com infecção por *Candida* spp. têm maior produção de aspártico peptidases quando comparadas com cepas isoladas de carreadores assintomáticos (Schaller *et al.*, 2005).

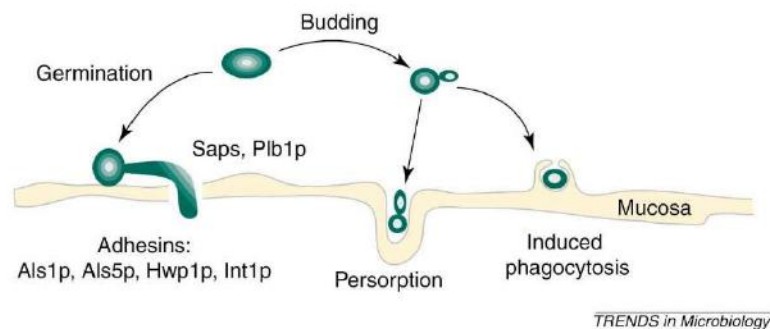


Figura 2 – Esquema de adesão de *Candida* na mucosa. Os primeiros eventos na patogênese da candidíase são retratados na superfície de uma mucosa. Uma célula de *C. albicans* é mostrada germinando (esquerda). Adesinas (Als1p, Als5p, Hwp1p, Int1p) e enzimas (Saps e Plb1p) promovem a aderência às células do hospedeiro. Na direita, é mostrada a fagocitose induzida da levedura por uma célula da mucosa. As enzimas Sap são peptidases, enquanto a Plb1p é uma fosfolipase (Calderone e Fonzi, 2001).

1.5.2. Hemolisinas e sideróforos

Ferro é um elemento importante como cofator em diversos processos metabólicos celulares de vários microrganismos, incluindo *Candida* spp. Entretanto, o ferro não é encontrado livremente disponível na corrente sanguínea do hospedeiro humano, devido ao seu sequestro por moléculas próprias como transferrinas e a própria hemoglobina (Knight *et al.*, 2005). O sequestro de ferro é um mecanismo natural do hospedeiro devido a sua natureza tóxica em altas concentrações por formar radicais livres de oxigênio e para privar microrganismos de nutrientes essenciais para a progressão da infecção (Fourie *et al.*, 2018). Para adquirir este elemento, espécies de *Candida* se utilizam de três mecanismos de captação de ferro na corrente sanguínea ilustrados na figura 3. Nosso foco de estudo reside na produção de hemolisinas e sideróforos, fatores de virulência utilizados pelo patógeno para lisar eritrócitos e capturar o ferro disponibilizado no sangue, respectivamente (Chen *et al.*, 2011, Furlaneto *et al.*, 2018).

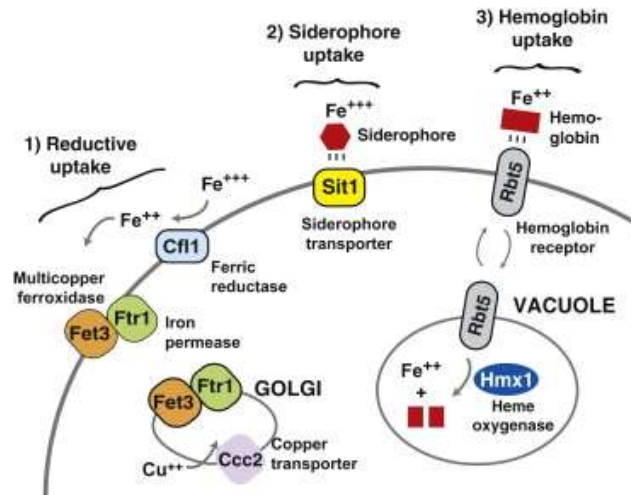


Figura 3 – Mecanismos de captura de ferro de *Candida* spp. São mostrados os principais fatores que mediam as três vias conhecidas de absorção de ferro de alta afinidade: absorção redutora de ferro através da redução do ferro e transporte através de Ftr1 e Fet3, absorção de sideróforos ligados ao ferro através do transportador de sideróforos Sit1 e absorção de hemoglobina-ferro através do transportador Rbt5 (Chen *et al.*, 2011).

1.5.3. Lipases

Fosfolipídios são encontradas nas membranas plasmáticas de quase todos os organismos vivos, tendo o papel de manter a integridade das células e suas vesículas. São moléculas compostas por duas cadeias hidrofóbicas e um grupamento fosfato unidas por um resíduo de álcool. A fosfatidilcolina é a molécula mais comum encontrada em membranas celulares e este fosfolipídio é o substrato das fosfolipases A, B, C e D de *C. albicans*, que clivam a molécula em diferentes conformações dependendo da enzima, formando produtos que podem ser tóxicos para o hospedeiro e causando danos celular e tecidual devido à destruição das membranas celulares. (Niewerth e Korting, 2001). Há evidências que apontam que mutantes de *C. albicans* sem o gene *caPLB1*, que codifica a fosfolipase, têm virulência atenuada quando comparados com cepas selvagens (Leidich *et al.*, 1998; Ghannoum, 2000), e é sugerido que alta atividade está associada com persistência da infecção (Schaller *et al.*, 2005). Embora estas fosfolipases específicas tenham sido documentadas apenas em *C. albicans*, atividade de fosfolipase já foi detectada em outras espécies de *Candida* (Mohan Das e Ballal, 2008; Sidrim *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2015; Sharma, Chumber e Kaur, 2017).

Da mesma forma, esterases atuam quebrando ligações éster em diglicerídeos e triglicerídeos de membrana formando poros que danificam a célula e permitem a invasão e adesão ao tecido (Nouraei *et al.*, 2021). Alta atividade destas lipases está associada com maior virulência em diversas espécies de *Candida* (Tsuboi, Komatsuzaki e Ogawa, 1996, Schaller *et al.*, 2005).

1.5.4. *Fitases*

O fitato, ou ácido fítico, é uma molécula que armazena 60% do fósforo em plantas (Lei e Porres, 2003). Devido à dieta humana, fitato pode ser encontrado no tubo gastrointestinal, embora não prontamente disponível para absorção, pois facilmente se associa com elementos metálicos como zinco e cobre, formando complexos estáveis (Konietzny e Greiner, 2001). Fitases quebram o fitato em inositol, grupamentos fosfato e os separam de outros elementos metálicos que tornam sua absorção fastidiosa (Sharma *et al.*, 2020). *Candida spp.* se utilizam da síntese de inositol a partir de glicose-6-fosfato ou, em situações em que a síntese não é possível, do seu transporte para dentro da membrana através de receptores. Para disponibilizar o inositol e o fosfato, o patógeno pode produzir fitases extracelulares para quebrar o fitato (Figura 4). Mutações nos genes que regulam a síntese e transporte do inositol resultaram em cepas não virulentas de *C. albicans*, e a produção e absorção desta enzima pode estar associada a sobrevivência de espécies de *Candida* no trato gastrointestinal (Tsang, 2011), e foi encontrada uma correlação significativa entre a produção de fitase e a resistência a antifúngicos em *C. glabrata* (Figueredo-Carvalho *et al.*, 2017).

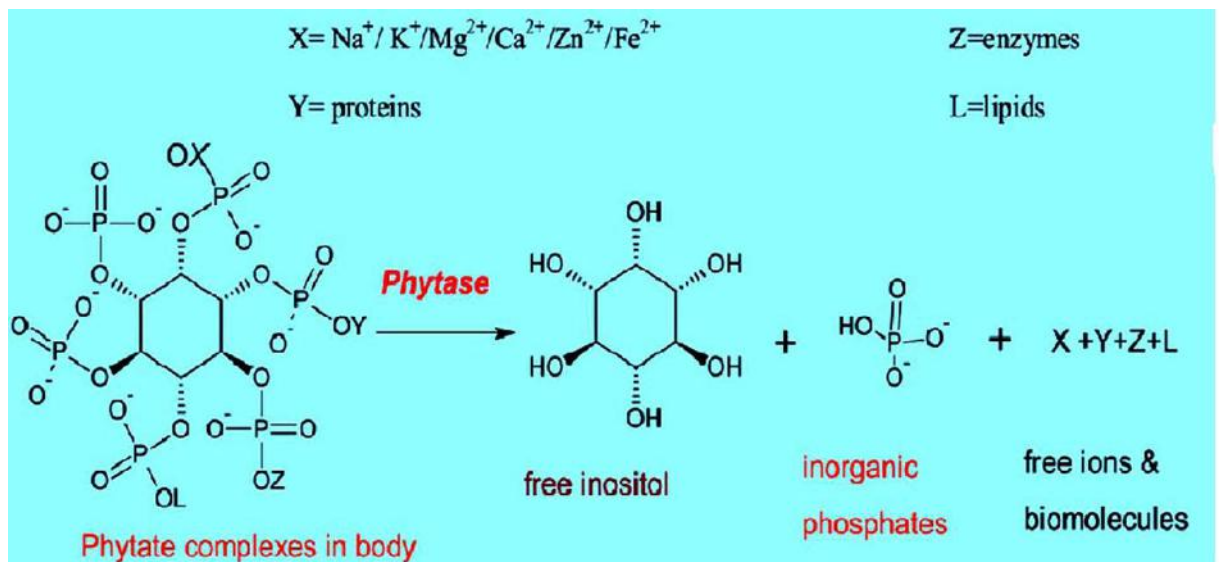


Figura 4 – Atividade das fitases sobre os complexos de fitato, libertando o inositol para ser absorvido pelas células de microrganismos (Sharma *et al.*, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo de espécies ambientais de *Candida* se alinha com os objetivos da iniciativa *One Health* da OMS para o controle de infecções humanas que podem surgir do ambiente. Neste trabalho buscamos identificar e quantificar as moléculas secretadas pelas espécies de *Candida* isoladas do peixe tambaqui, visando minimizar a contaminação dos peixes e a possível transferência destes patógenos para os consumidores. A identificação dos isolados está sendo feita em paralelo e nos permitirá comparar nossos resultados com os obtidos por outros cientistas e determinar se estes peixes estão sendo expostos a cepas potencialmente patogênicas.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo identificar as espécies da coleção e quantificar diferentes classes de moléculas secretadas (peptidases, lipases, esterases, fitases, sideróforos e hemolisinas) por 38 isolados de *Candida* recuperados de esôfago/estômago, intestino anterior e intestino posterior de peixes tambaqui (*Colossoma macropomum*), advindos de aquacultura no estado do Piauí, utilizando-se meios de cultura contendo substratos específicos para cada molécula secretada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção, transporte e descrição da coleção

A coleção de isolados utilizada foi anteriormente utilizada em outro estudo realizado na região Nordeste e cedido a nós pelo Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os protocolos de coleta são semelhantes aos descritos por Pinheiro *et al.*, 2018. Os isolados coletados foram das seguintes regiões anatômicas do tambaqui: estômago e esôfago; intestino anterior; intestino posterior, totalizando 38 isolados (Tabela 2). Comitê de ética animal número 613/19, aprovado no dia 16/12/19.

Tabela 2 – Identificação dos isolados estudados e região anatômica do peixe de onde foram isolados. (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior)

Região anatômica	Identificação do isolado
Estômago/esôfago (n=10)	1, 2, 3, 4, 5, 21, 22, 23, 24,38
Intestino anterior (n=19)	6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37
Intestino posterior (n=9)	12, 13, 20, 31, 32, 33, 34, 35, 36

Os isolados foram conservados em solução de glicerol à 30% e congelados para transporte, e conservados a 4°C. A reativação dos isolados foi feita em meio Sabouraud enriquecido com 5% de soro fetal bovino. Estes isolados reativados foram então plaqueados em meio Sabouraud sólido para manutenção das colônias.

4.2. Identificação Presuntiva

4.2.1. *Cultivo em meio CHROMagar Candida*

Os isolados congelados foram inoculados em meio Sabouraud líquido enriquecido com 5% de soro fetal bovino para a reativação e incubados a 37 °C por 24h. Após este período, cada isolado foi inoculado em uma placa de ágar Sabouraud sólido e incubado à 37 °C por 24 horas em preparação para o experimento. Após serem reativados do estoque os isolados foram inoculados utilizando alças autoclavadas em meio Sabouraud e incubados a 37°C por 48h. Estes isolados foram então semeados em placas de Petri contendo o meio CHROMagar Candida® e incubados a 37 °C por 48-72 h para avaliação da pureza das culturas. A interpretação dos resultados foi baseada nas orientações do fabricante, a saber: colônias de coloração verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa/rugosa, *C. krusei*; branca a rosada, *C. parapsilosis*.

4.3. Avaliação do perfil de moléculas secretadas

Para avaliar a produção de cada molécula secretada, foram utilizados meios específicos com os substratos capazes de induzir sua produção. Cada isolado foi incubado por 48 horas à 37 °C e após este período uma alíquota de 10 µL foi inoculada em triplicata ou duplicata na placa com o substrato de interesse. A quantificação da atividade de cada isolado foi realizada no quinto dia para hemolisinas e sideróforos ou sétimo dia para as demais enzimas utilizando o valor P_z , uma razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro do halo de degradação como descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982). Os valores de corte para determinar em qual categoria (não produtor, produtor fraco, moderado e forte) cada isolado se encontra foram determinados a partir do trabalho de Ramos *et al.* (2015), a saber: $P_z = 1,0$ – não produtor de enzima; $0,999 \geq P_z > 0,700$ – produtor fraco; $0,699 \geq P_z > 0,400$ – produtor moderado; e $0,399 \geq P_z > 0,100$ – produtor forte.

4.3.1. *Teste para produção de aspártico-peptidases*

A produção de aspártico-peptidases foi determinada utilizando-se o meio ágar albumina, composto por 2,35% de base de carbono para leveduras (YCB; Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma-Aldrich), pH 4,0, conforme descrito por Rùchel, Tegeler e Trost (1982). A atividade de aspártico-peptidases resulta na formação de um halo de degradação ao redor da colônia, que corresponde à hidrólise do BSA presente no meio.

4.3.2. *Teste para a produção de metalo/serino peptidases*

A atividade de metalo/serino peptidases foi determinada utilizando-se o meio ágar caseína (composto por 20 g de glucose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 4 g de caseína, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada). A degradação da caseína será identificada pela presença de um halo de degradação translúcido ao redor da colônia (Ramos, 2017).

4.3.3. *Teste para a produção de fitase*

A atividade de fitase foi determinada utilizando-se o meio ágar fitato de cálcio (composto por 10 g de glucose, 0,5 g de sulfato de amônio, 0,2 g de cloreto de potássio, 0,1 g de sulfato de magnésio, 2 g de fitato de cálcio, 0,5 g de extrato de levedura, 0,005 g de sulfato de manganês, 0,005 g de sulfato ferroso, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). A atividade de fitase foi identificada pela presença de um halo de degradação translúcido ao redor da colônia, indicando a hidrólise do fitato de cálcio, conforme descrito por Ramos (2017).

4.3.4. *Teste para a produção de fosfolipase*

A atividade de fosfolipase foi determinada utilizando-se o meio ágar gema de ovo (composto por 20 g de glucose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 40 g de cloreto de sódio, 0,74 g de cloreto de cálcio, 20 mL de gema de ovo, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). A hidrólise dos lipídios presentes na gema do ovo resulta na formação de um complexo de cálcio com os ácidos graxos liberados pela ação das enzimas secretadas, resultando em uma zona de precipitação ao redor da colônia (Ramos, 2017).

4.3.5. *Teste para a produção de esterase*

A atividade de esterase foi determinada utilizando-se o meio ágar Tween 80 (composto por 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 0,1 g de cloreto de cálcio, 1 mL de Tween 80, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). A hidrólise do Tween 80 resulta na liberação de ácidos graxos que se ligam ao cálcio, formando um halo de precipitação ao redor da colônia (Ramos, 2017).

4.3.6. *Teste para a produção de sideróforos*

A atividade dos sideróforos foi determinada utilizando meio ágar CAS (composto por 60,5 mg de chromeazurol S, 0,0027g de FeCl₃ diluído em 10 mM de HCl e 72,9 mg de HDTMA, como descrito por Lakshmanan *et al.* (2015), infundidos em meio PDA sólido. O resultado positivo resulta na formação de um halo laranja ao redor da colônia.

4.3.7. Teste para a produção de hemolisinas

A atividade hemolítica foi determinada utilizando meio Sabouraud enriquecido com 3% de glicose e 7% de sangue de cordeiro como descrito por Abi-Chacra *et al.* (2013). A atividade foi verificada pela presença de um halo de hemólise ao redor das colônias.

4.4. Análise estatística

Cada isolado foi testado em triplicata e os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de Student. Valores de *P* menores que 0,05, indicando 95% de confiança, foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação presuntiva dos isolados fúngicos por CHROMagar Candida

Os resultados obtidos no meio CHROMagar Candida resultaram inconclusivos. Apenas o isolado 10 originou cor no referido meio, resultando em uma colônia lilases/rosadas (Figura 5). As demais colônias se apresentaram com cor creme, sugerindo a presença de espécies não identificadas presuntivamente por este meio cromogênico, possivelmente sugerindo que estes isolados pertencem ao grupo das espécies de *Candida* não-*albicans*.



Figura 5 – Placa de meio CHROMagar com o isolado p10 (p713), aque apresentou uma coloração lilás.

5.2. Lipases

Nossos resultados mostraram que nenhum dos isolados fúngicos, recuperados dos três sítios anatômicos estudados (estômago/esôfago, intestino anterior, intestino posterior), foi capaz de produzir fosfolipases e esterases após o dia 7 do experimento nas condições experimentais empregadas.

5.3. Metallo/serina peptidases

Conforme mostrado na figura 5, 35 dos 38 (92,1%) isolados estudados foram positivos para o teste de detecção de metallo/serino peptidases após 7 dias de incubação. A atividade foi detectada em 8 isolados do estômago/esôfago (8/10; 80%), 16 isolados do intestino anterior (16/19; 84,2%) e em todos os 9 (100%) isolados do intestino posterior. A atividade detectada foi considerada fraca em todos os isolados positivos ($0,999 \geq Pz > 0,700$). Foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos EE e IA e EE e IP (Figura 6) ($P < 0,05$ Teste t de Student, homocedástico, unicaudal).

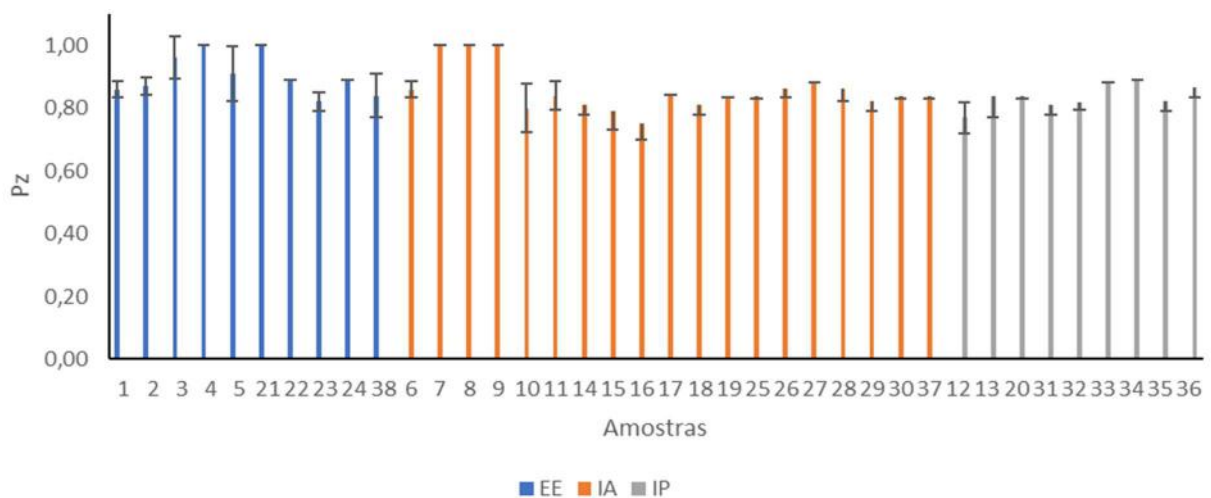


Figura 6 - Detecção da atividade de metallo/serina peptidases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos de peixes tambaqui após 7 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

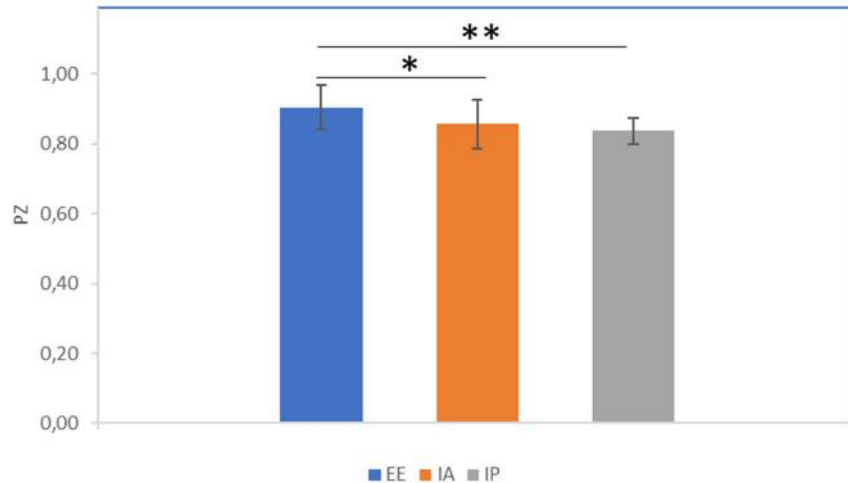


Figura 7: Média da produção de metalo/serina peptidases entre os isolados de peixes tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolo (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ($P < 0,05$). O símbolo (**) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ($P < 0,005$). EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

5.4. Aspártico peptidases

Nossos resultados mostraram que 21 dos 38 (55,3%) isolados tiveram produção positiva de aspártico peptidases no sétimo dia do experimento em meio YCB-BSA. A atividade foi detectada em 5 isolados do estômago/esôfago (5/10; 50%), 11 isolados do intestino anterior (11/19; 57,9%) e 5 isolados do intestino posterior (5/9; 55,6%) (Figura 7). Foi encontrada atividade média (valor de Pz entre 0,400 e 0,699) em 12 dos 38 isolados e fraca (valor de Pz entre 0,700 e 0,999) em 9 dos 38 isolados. Não foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos anatômicos EE, IA e IP (Figura 8) (Teste t de Student, homocedástico, unicaudal).

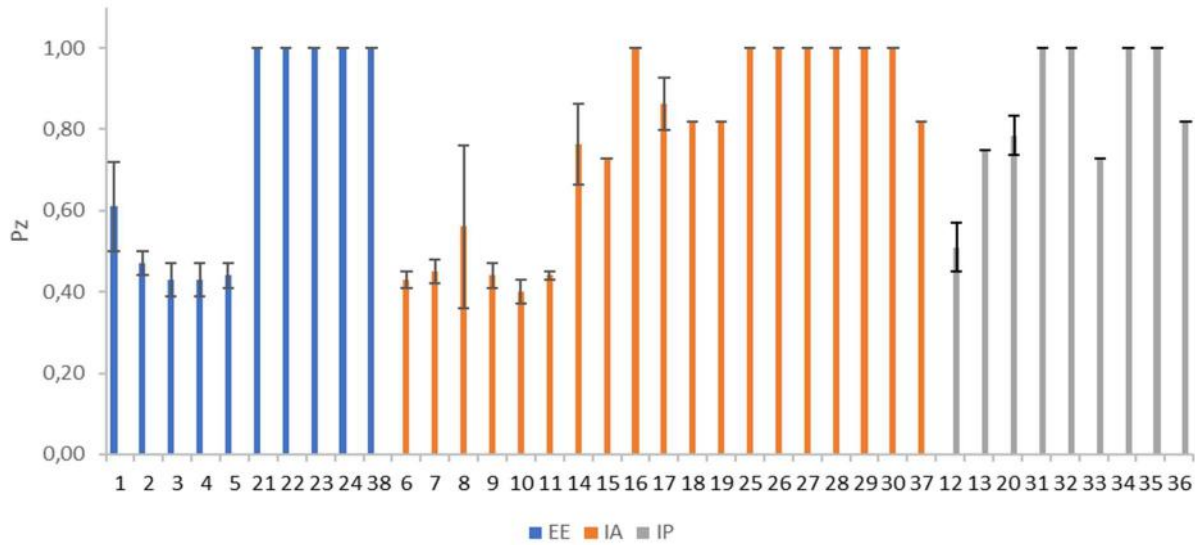


Figura 8: Detecção da atividade de aspártico-peptidases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos de peixes tambaqui após 7 dias de incubação em meio YCB-BSA. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

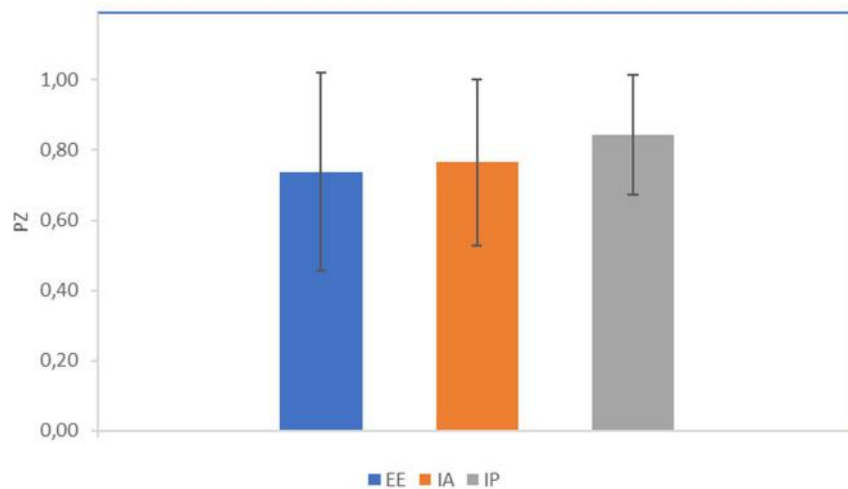


Figura 9: Média da produção de aspártico-peptidases entre os isolados de peixes tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

5.6 Fitases

Dos isolados estudados, 12 das 38 (31,6%) foram positivos para fitases no sétimo dia do experimento. A atividade foi detectada em 5 isolados do estômago/esôfago (5/10; 50%), 6 isolados do intestino anterior (6/19; 31,6%) e 1 isolados do intestino posterior (1/9; 11,1%) (Figura 9). A atividade encontrada foi considerada média para 10 dos 38 isolados (valores de

Pz entre 0,400 e 0,699) e fraca para 2 isolados (valores de Pz entre 0,700 e 0,999). Não foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos EE e IA, mas ambos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo IP (Figura 10) ($P < 0,05$).

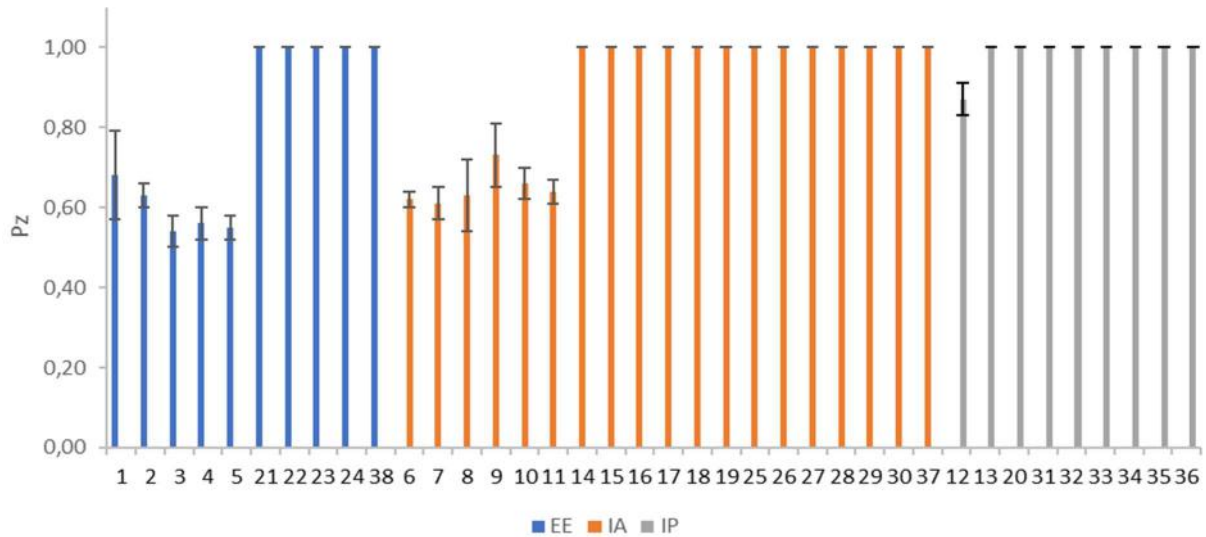


Figura 10: Detecção da atividade de fitases nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos de peixes tambaqui após 7 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico (EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior).

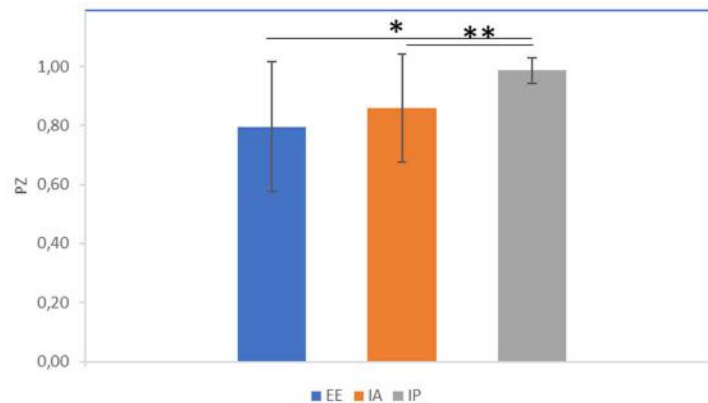


Figura 11: Média da produção de fitases entre os isolados de peixes tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolos (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de $P < 0,01$ e $P < 0,005$, respectivamente. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

5.7 Hemolisinas

Todas os isolados testaram positivo para a produção de hemolisinas em ágar sangue no quinto dia do experimento (Figura 11). Devido a complicações na metodologia, o isolado 38 não pode ser medido no quinto dia. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa

para a produção de hemolisinas entre os grupos estudados (Figura 12) (Teste t de Student, homocedástico, unicaudal), ou seja, não há diferença significativa entre os grupos esôfago/estômago, intestino anterior e intestino posterior.

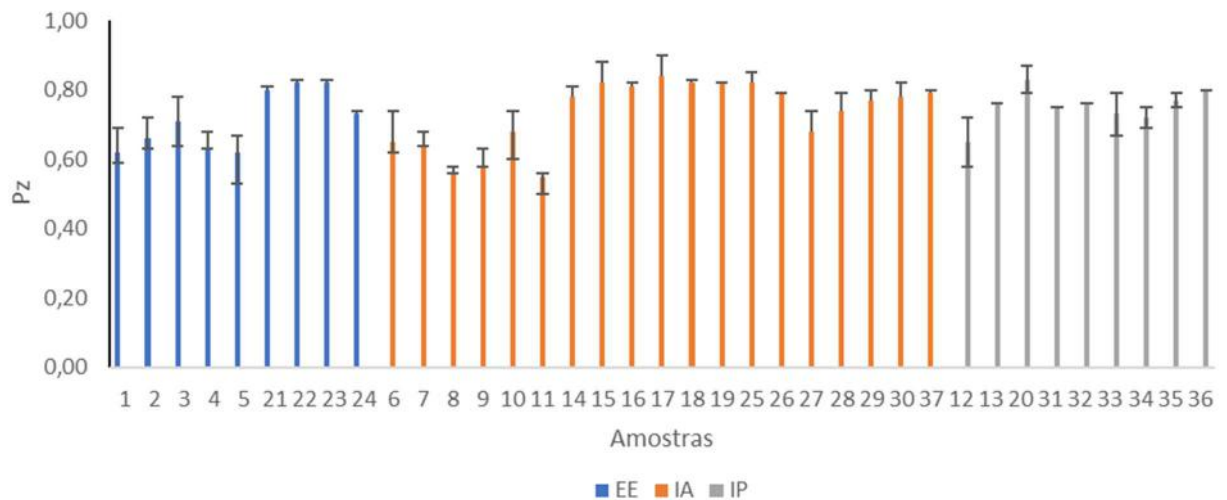


Figura 12: Detecção da atividade de hemolisinas nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos de peixes tambaqui após 5 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

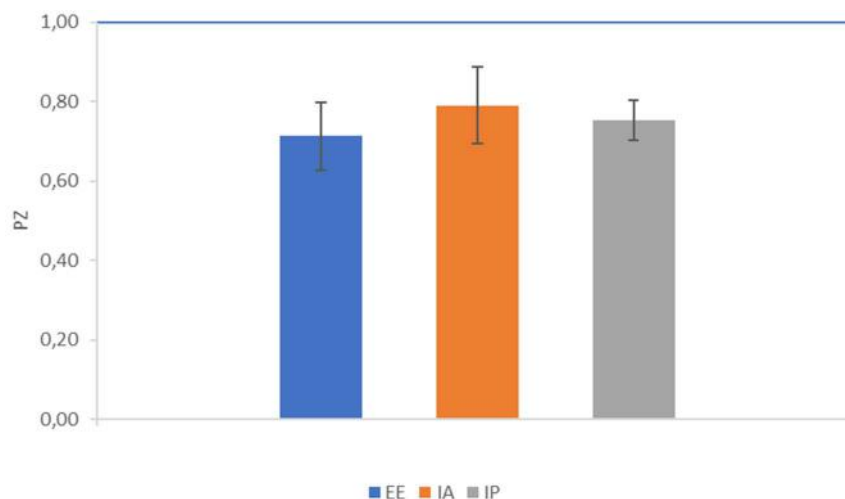


Figura 13: Média da produção de hemolisinas entre os isolados de peixes tambaqui no quinto dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

5.8 Sideróforos

Nossos resultados apontaram produção de sideróforos em 20 dos 38 (52,6%) isolados estudadas, sendo 8/10 (80%) positivos nos isolados coletados do esôfago/estômago, 8/18

(44,4%) positivos na região do intestino anterior e 5/9 (55,6%) positivos no intestino posterior (Figura 13). O isolado 6 não pode ser demonstrada no experimento devido a dificuldades na metodologia. Nossos resultados demonstraram diferença significativa apenas entre os grupos EE e IA (Figura 14) ($P < 0,05$ Teste t de Student, homocedástico, unicaudal).

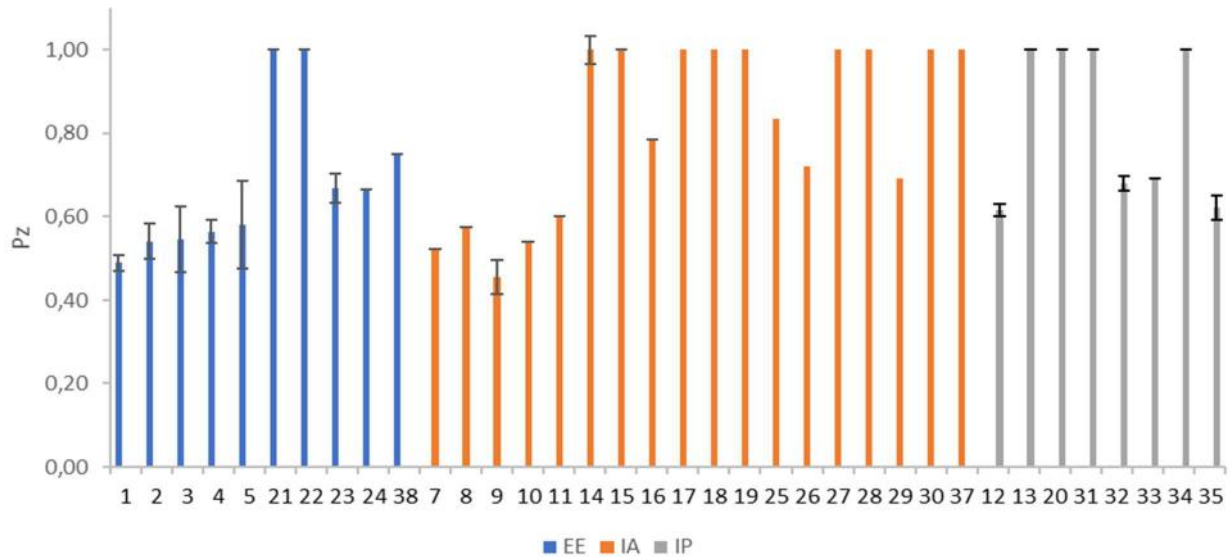


Figura 14: Detecção da atividade de sideróforos nos isolados de *Candida* recuperados de diferentes sítios anatômicos de peixes tambaqui após 5 dias de incubação em meio contendo caseína como substrato. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de cada isolado fúngico. EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

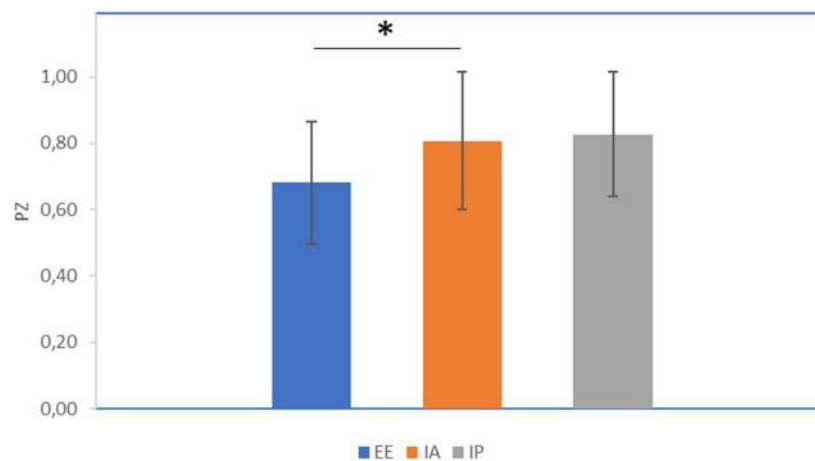


Figura 15: Média da produção de sideróforos entre os isolados de peixes tambaqui no sétimo dia de incubação em meio contendo caseína. Os resultados são expressos como média e desvio padrão referente a todos os isolados de cada sítio anatômico. O símbolo (*) indica diferença estatisticamente significante entre os grupos ($P < 0,05$). EE = Esôfago/estômago. IA = Intestino anterior. IP = Intestino posterior.

6. DISCUSSÃO

O estudo de infecções por fungos isolados do tabaqui tem importância econômica e social no contexto nacional devido à relevância da aquicultura na economia local e nacional. A perda do produto e a possível transferência de patógenos para humanos pode levar a impactos importantes na economia e sistemas de saúde, fazendo-se necessário o estudo com uma abordagem baseada na iniciativa *One Health* para minimizar o impacto destas espécies de *Candida*. Nosso estudo busca jogar luz sobre as moléculas associadas à virulência secretadas por *Candida* spp. isoladas do tabaqui, que fazem parte de importantes interações patógeno-hospedeiro e podem ter um papel crucial na infecção do tabaqui e possivelmente do ser humano.

Há escassa literatura sobre a produção de enzimas extracelulares de *Candida* nestes peixes. No Brasil, foi relatado que *C. parapsilosis* é a principal espécie encontrada em água potável e do mar (Ishida *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2019; Arroyo *et al.*, 2020). Cupozak-Pinheiro *et al.* (2021) estudaram águas de lençóis freáticos do estado do Mato Grosso e conseguiram isolar *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. palmiroleophila*.

A identificação em meio CHROMagar mostrou-se limitada em nosso estudo. A inoculação dos isolados neste meio resultou em colônias de cor creme com exceção de uma colônia de cor lilás/rosada. Esta limitação deve-se ao fato que apenas espécies comumente encontradas no meio clínico (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) são cobertas por este método, fazendo com que espécies ambientais e isolados mais incomuns escapem da cobertura, tornando necessário o uso de métodos moleculares como a amplificação e sequenciamento do gene *ITS* para a sua identificação. Nesse sentido, nosso grupo amplificou o gene *ITS* dos isolados fúngicos e enviou para sequenciamento.

A tabela 3 resume nossos resultados e é possível apontar alguns dados interessantes, como a produção de sideróforos. Há poucos relatos envolvendo sideróforos em *Candida* spp. Muitos estudos apontam incerteza sobre a capacidade do gênero *Candida* de produzir sideróforos, focando na sua capacidade de capturar ferro do meio através de transferrinas e captura de hemoglobina e xenosideróforos (Knight *et al.*, 2005; Noble, 2013). Entretanto, Ramos *et al.* (2022) identificaram a produção de sideróforos em 25 isolados clínicos de *C. haemulonii* isolados do estado do Rio de Janeiro. Nossos resultados mostraram que 20 dos 38 isolados de peixes apresentaram resultado positivo no meio CAS (aparecimento de halo vermelho ao redor

das colônias), sugerindo que a produção de sideróforos no gênero *Candida* pode ser mais prevalente do que imaginado.

Tabela 3 – Resumo das médias com desvio padrão da produção das moléculas secretadas de todas as cepas estudadas

Sítio Anatômico	Fosfolipases	Esterases	Metaló/serino peptidases	Aspártico peptidases	Fitases	Hemolisinas	Sideróforos
Esôfago/Estômago	1,00 ± 00	1,00 ± 00	0,90 ± 0,06	0,74 ± 0,28	0,80 ± 0,22	0,71 ± 0,08	0,68 ± 0,18
Intestino Anterior	1,00 ± 00	1,00 ± 00	0,86 ± 0,07	0,76 ± 0,24	0,86 ± 0,18	0,73 ± 0,10	0,83 ± 0,21
Intestino Posterior	1,00 ± 00	1,00 ± 00	0,84 ± 0,04	0,84 ± 0,17	0,99 ± 0,04	0,75 ± 0,05	0,83 ± 0,19

A incapacidade de produção de fosfolipases é similar aos resultados encontrados por Ramos *et al.* (2015). Para *Candida* não-*albicans* isoladas de candidíase cutânea, apenas 2 dos 49 isolados identificados como *C. ciferi* (2/5) foram positivos para fosfolipase, enquanto que produção de fosfolipases não foi encontrada em *C. famata* (0/11), *C. guilliermondii* (0/4), *C. haemulonii* (0/7), *C. lipolytica* (0/3), *C. parapsilosis* (0/16) e *C. tropicalis* (0/3).

Pakshir *et al.* (2013) estudaram *Candida* spp. em amostras de pacientes com onicomicose e lesões orais. Os resultados dos testes de esterase mostraram que 87% das cepas de *C. albicans* e 47% das de *C. parapsilosis* de onicomicose produziram halos de opacidade ao redor de suas colônias em 10 dias, enquanto 78,57% das cepas de *C. albicans* das lesões orais também foram positivas para esterase. Houve uma diferença significativa entre *C. albicans* e *C. parapsilosis* nos isolados de onicomicose (P valor=0,001), mas entre os isolados de *C. albicans* nos grupos de onicomicose e lesões orais para atividade de esterase (P = 0,65). Todos os isolados de *C. albicans* produziram esterase no terceiro dia, enquanto os isolados de *C. parapsilosis* iniciaram atividade enzimática em dias diferentes. No entanto, Ge *et al.* (2011) ao investigarem a atividade enzimática de 149 isolados de *Candida* coletadas em pacientes hospitalizados, concluíram que a maioria deles não apresentava atividade para esterase, assim como Cupozak-Pinheiro *et al.* (2021), que encontraram atividade de esterases apenas em cepas de *C. parapsilosis* (n=13) e *C. tropicalis* (n=2) de um total de 24 isolados. Similarmente, não observamos a produção de esterases em nenhum dos 38 isolados da coleção. Ambas as moléculas, fosfolipase e esterase, estão associadas à virulência através da quebra de estruturas presentes na membrana do hospedeiro e invasão intracelular de hifas, permitindo a progressão de uma infecção. Nossos resultados sugerem que as espécies encontradas nestes peixes não têm esta capacidade devido a aparente incapacidade de produção destas enzimas hidrolíticas, sugerindo menor capacidade de oportunismo com nenhum isolado demonstrando atividade de

fosfolipase detectável, mesmo após 7 dias de incubação. Entretanto, a metodologia utilizada pode não ter a sensibilidade necessária para a detecção de lipases produzidas pelos isolados, e existem protocolos como descrito por Chen *et al.* (2013) que descrevem o uso de lipossomos contendo partículas de ouro fluorescente que podem detectar estas moléculas com maior precisão.

Segundo Pakshir *et al.* (2013), dentre os isolados de *C. parapsilosis*, um total de 20 cepas (43,47%) não apresentavam atividade de fosfolipase ou esterase, mas apenas uma delas não apresentava atividade hemolítica. Dentre os isolados de *C. albicans*, um de lesões orais e um de onicomicose, não foi encontrada atividade de fosfolipase ou esterase, mas ambos revelaram atividade hemolítica. Cupozak-Pinheiro *et al.* (2021) encontraram atividade hemolítica em todos os isolados encontrados em águas de lençóis freáticos (24/24), mas apenas as cepas de *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* eram capazes de produzir fosfolipases. Amani *et al.* (2018) avaliaram a atividade hemolítica de isolados coletados em aterro sanitário, concluindo que a maioria das espécies de *Candida* encontradas era capaz de degradar a hemoglobina. Analogamente, nossos resultados mostraram atividade hemolítica em todos os isolados após 5 dias de cultivo em meio ágar sangue.

Amani *et al.* (2018) avaliaram ainda a atividade proteolítica desses isolados e mostraram em seu estudo que 86,04% das cepas de *Candida* testadas produziam aspártico peptidases, sendo sua produção distribuída nas quatro espécies de *Candida* estudadas (*C. lusitaniae*, *C. robusta*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) com dominância de *C. krusei*. Contudo, Qingxiang *et al.* (2013), ao estudarem 257 isolados de sangue não encontraram atividade de qualquer tipo de peptidase na maioria dos isolados de *Candida*. Maciel *et al.* (2019) ao estudarem isolados de *Candida* spp. advindos de areia e águas marítimas, concluíram que 28 de 47 isolados não possuíam atividade proteolítica. Nossos resultados apontaram a produção de serino/metalo peptidases em 35 dos 38 isolados quando incubadas em meio caseína, e a produção de aspártico-peptidases em 21 dos 38 isolados, mostrando que as cepas estudadas apresentam atividade proteolítica, ainda que fraca.

Nossos resultados apontam a produção moderada de fitases em 12 dos 38 isolados observados no sétimo dia. Enquanto a produção de fitases seja associada a quebra de fitato para a captura de fosfato do meio, Figueredo-Carvalho *et al.* (2017) descreveram uma associação entre a produção de fitases e a resistência à anfotericina B. Ensaios de Concentração inibitória mínima poderão futuramente esclarecer este ponto nas cepas estudadas no presente trabalho.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados fúngicos recuperados de tabaqui não puderam ser identificados por CHROMagar Candida. Futuros ensaios moleculares poderão esclarecer a identidade destas espécies.

- As espécies de *Candida* não apresentaram a capacidade de secretar lipases (esterases e fosfolipases).

- Apenas 12 dos 38 isolados apresentaram a secreção de fitases.

- Em relação às peptidases, 35 dos 38 isolados apresentaram secreção de metalo/serina peptidases e 21 dos 38 isolados foram positivas para aspártico peptidases.

- Todos os isolados foram capazes de secretar hemolisinas.

- Aproximadamente metade dos isolados (20 dos 38) apresentaram resultado positivo no meio CAS, indicando a produção de sideróforos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Chacra, É.A., Souza, L.O., Cruz, L.P., Braga-Silva, L.A., Gonçalves, D.S., Sodr , C.L., Ribeiro, M.D., Seabra, S.H., Figueiredo-Carvalho, M.H., Barbedo, L.S. e Zancop -Oliveira, R.M. (2013). Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Research*, 13(8), 831-848.
- Amani D., Emira N., Ismail, T., Jamel E., Dominique S., Rosa, D.C. e Mejdj S. (2018). Extracellular enzymes and adhesive properties of medically important *Candida* spp. strains from landfill leachate. *Microbial Pathogenesis* 116, 328-334.
- Angebault, C., Djossou, F., Abelanet, S., Permal, E., Ben Soltana, M., Diancourt, L., Bouchier, C., Woerther, P.L., Catzeflis, F. e Andremont, A. (2013). *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *J Infect Dis*, 208, 1705-1716.
- Arroyo, M.G., Ferreira, A.M., Frota, O.P., Brizzotti-Mazuchi, N.S., Peresi, J.T.M., Rigotti, M.A., Macedo, C.E., Sousa, A.F.L.D., Andrade, D.D. e Almeida, M.T.G.D. (2020). Broad diversity of fungi in hospital water. *The Scientific World Journal*, 2020.
- Babu, D.T., Antony, S. P., Joseph, S.P., Bright, A. R. e Philip, R. (2013). Marine yeast *Candida aquaetextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 112 (3), 243-252.
- Bizzaro, G., Vatland, A. K. e Pampanin D. M. (2022). The One-Health approach in seaweed food production, *Environment International*, 158, 106948.
- Butler, J.G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L. e Agrafioti, I. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657–662.
- Cabello, F. C. e Godfrey, H. P. (2019). Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and *One Health*: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health. *Aquaculture*, 507, 451-456.
- Calderone, R. e Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9, 327-335,
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., e Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62, 130-180.
- Chen, C., Pande, K., French, S.D., Tuch, B.B. e Noble, S.M. (2011). An Iron Homeostasis Regulatory Circuit with Reciprocal Roles in *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis. *Cell Host & Microbe* 10, 118-135,
- Cupozak-Pinheiro, W.J., Almeida-Apolonio, A.A.; Sasaki, M. H., Maran, N. H., Araujo, R. P., Silva, D. B. S., Santos, J. V.A., Baruffatti, A., Chang, M. R. e Oliveira, K. M. P. (2022). *Candida* species contamination in drinking groundwater from residence wells in three municipalities of midwestern Brazil and the potential human health risks. *Microbial Pathogenesis*, [S.L.], 169,105660.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y. e Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis* 117, 128-138.
- De Bernardis, F., Mondello, F., San Mill n, R., Pont n, J. e Cassone, A. (1999). Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3481-3486.
- De Luca, C., Guglielminetti, M., Ferrario, A., Calabr, M. e Casari, E. (2012). Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 35, 459-468.
- Dobi s, R. e Havl cek, V. (2021) Chapter 2 - Microbial siderophores: Markers of infectious diseases. In: *Microbial and Natural Macromolecules*, Surajit Das e HIRAK Ranjan Dash, *Microbial and Natural Macromolecules*, eds. (Academic Press), 57-72.
- dos Santos, F. A. C., da Costa Julio, G. S., Batista, F. S., Miranda, L. N. L., Pedras, P. P. C. e Luz, R. K. (2022). High stocking densities in the larviculture of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system: Performance, survival and economic viability. *Aquaculture*, 552, 738016.
- Dunn, B.M. (2013). Aspartic Proteases. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Second Edition, eds. (Elsevier), 137-140.

- Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Ramos, L. D. S., Barbedo, L. S., Oliveira, J. C. A. D., Santos, A. L. S. D., Almeida-Paes, R. e Zancopé-Oliveira, R. M. (2017). Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. *Mediators of Inflammation*.
- Fourie R., Kuloyo O.O., Mochochoko B.M., Albertyn J. e Pohl C.H. (2018). Iron at the Centre of *Candida albicans* Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8.
- Furlaneto, M.C., Góes, H.P., Perini, H.F., Dos Santos, R.C. e Furlaneto-Maia L. (2018). How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? *Folia Microbiol (Praha)*. 63, 4, 405-412. doi: 10.1007/s12223-018-0584-5.
- Gao, F., Liao, S., Liu, S., Bai, H., Wang, A e Ye, J. (2019). The combination use of *Candida tropicalis* HH8 and *Pseudomonas stutzeri* LZX301 on nitrogen removal, biofloc formation and microbial communities in aquaculture, *Aquaculture*, 500, 50-56.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 13, 122-143.
- Ge, Y.P., Lu, G.X., Shen, Y.N. e Liu, W.D. (2011). In vitro evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*, *Mycopathologia* 172, 429–438.
- Hallen-Adams, H.E. e Suhr, M.J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8, 352-358.
- Hambrey, J. (2017). The 2030 Agenda and the sustainable development goals: the challenge for aquaculture development and management. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*.
- Ishida, K., Ueda-Yamaguchi, M., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Yamada-Ogatta, S. F. e Nakamura, C. V. (2013). Performance of methods for identification of yeasts isolated from bottled water: High prevalence of *Candida parapsilosis*. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 34, 205-214.
- Kantarcioglu, A.S. e Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses* 45, 160-165.
- Knight, S.A.B., Vilaire, G., Lesuisse, E. e Dancis, A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect.Immun.* 73, 5482-5492.
- Konietzny, U. e Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology*, 37: 791-812.
- Kumamoto, C.A., Gresnigt, M.S. e Hube B (2020). The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Curr Opin Microbiol*, 56, 7-15.
- Kumar, A. e Jha, A. (2017). Introduction. *Anticandidal Agents*. [S.L.], eds. (Elsevier), 1-5.
- Lee, B.K. e Kim, J. K. (2001). Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, 25, 111– 124.
- Lei, X.G. e Porres, J.M. (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25, 1787–1794.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. e Ghannoum, M. A. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 26078-26086.
- López-Verdejo, A., Born-Torrijos, A., Montero-Cortijo, E., Raga, J. A., Valmaseda-Angulo, M., e Montero, F. E. (2022). Infection process, viability and establishment of *Anisakis simplex* s.l L3 in farmed fish; A histopathological study in gilthead seabream. *Veterinary Parasitology*, 311, 109805.
- Maciel, N.O., Johann, S., Brandão, L.R., Kucharíková, S., Morais, C.G., Oliveira, A.P., Freitas, G.J., Borelli, B.M., Pellizzari, F.M., Santos, D.A. e Van Dijck, P. (2019). Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114.
- Mayer, F. L., Wilson, D. e Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4, 119-128.
- Mesquita, E.F.M., Calixto, F.A.A. e Takata, R. (2021). Chapter 14 - Probiotics and Prebiotics in Fish Aquaculture, Editor(s): Adriano Gomes da Cruz, C. Senaka Ranadheera, Filomena Nazzaro, Amir Mortazavian, Probiotics and Prebiotics in Foods, Academic Press.

- Mitchell, K.F., Zarnowski, R., Sanchez, H., Edward, J.A., Reinicke, E.L., Nett, J.E., Mitchell, A.P. e Andes, D.R. (2015) Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112:4092-4097.
- Mohan Das, V. e Ballal, M. (2008). Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micologia* 25, 4, 208–210.
- Morante, V. H. P., Copatti, C. E., Souza, A. R. L., da Costa, M. M., Braga, L. G. T., Souza, A. M. e Melo, J. F. B. (2021). Assessment the crude grape extract as feed additive for tambaqui (*Colossoma macropomum*), an omnivorous fish. *Aquaculture*, 544, 737068.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J. e Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 67, 400–428.
- Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C., Smith, D.P., Gesell, J.R., Ross, M.C., Stewart, C.J., Metcalf, G.A., Muzny, D.M. e Gibbs, R.A. (2017). The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort, *Microbiome*, 5, 153.
- Niewerth, M. e Korting, H.C. (2001). Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44, 361-367.
- Noble, S. (2013). *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. *Current Opinion in Microbiology* 16, 708-715.
- Nouraei, H., Jahromi, M. G., Jahromi, L. R., Zomorodian, K. e Pakshir, K. (2021). Potential Pathogenicity of *Candida* Species Isolated from Oral Cavity of Patients with Diabetes Mellitus. *BioMed Research International*, 2021.
- Nunes, E.M., Pereira, M.M., Costa, A.P., Araripe, M.N., Calvet, R.M., Pereyra, C.M., Azevedo, M.L., Pinheiro, R.E., Alves, V.C., Conde Júnior, A.M. e Ramos, L.S. (2019). Effects of aflatoxin B1 on performance and health of tambaqui fingerlings (*Colossoma macropomum*). *International Aquatic Research*, 11, 73-83.
- Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L.T., Romarheim, O. H. e Skrede, A. (2013). Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, 402–403, 1-7.
- Pakshir, K., Zomorodian, K., Karamitalab, M. Jafari, M., Taraz, H. e Ebrahimi H. (2013). Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions, *Journal de Mycologie Médicale* 23, 113-118.
- PEIXE BR (2022). Associação Brasileira de Piscicultura. Disponível em <https://www.peixebr.com.br/tambaqui-de-cultivo-producao-e-consumo-em-crescimento-no-pais/>.
- Pinheiro, R. E. E., Rodrigues, A. M. D., Santos, J. T. D. O., Costa, J. D. A., Pereyra, C. M., Torres, A. M. e Muratori, M. C. S. (2018). Occurrence and diversity of yeast species isolated from fish feed and tambatinga gut. *Latin american journal of aquatic research* 46, 837-842.
- Qingxiang, Y., Hao, Z., Xueling, L., Zhe, W., Ying, X., Siwei, R., Xuanyu, C., Yuanyuan, X., Hongxin, H. e Hailei, W. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems, *Bioresour. Technol.* 129, 264–273.
- Price, M. F., Wilkinson, I. D. e Gentry, L. O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20:1, 7-14.
- Ramesh, N., Priyadharsini, M., Sumathi, C. S., Balasubramanian, V. e Hemapriya, J. (2011). Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* spp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian J Microbiol.* 51, 273–278.
- Ramos, L. S., Barbedo, L. S., Braga-Silva, L. A., Santos, A. L. S., Pinto M.R. e Sgarbi, D. B. G. (2015). Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología* 32, 122-125, 1130-1406.
- Ramos, L.S. (2017). Complexo *Candida haemulonii*: aspectos da biologia celular e produção de potenciais fatores relacionados à virulência. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 141f.
- Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Silva, L. N., Siqueira, N. L., Lima, J. C., Oliveira, S. S., Almeida-Paes, R., Zancopé-Oliveira, R.M., Azevedo, F.S., Ferreira, A.L., Branquinha, M.H., e Santos, A. L. (2022). The Threat Called *Candida haemulonii* Species Complex in Rio de Janeiro State, Brazil: Focus on Antifungal Resistance and Virulence Attributes. *Journal of Fungi*, 8(6), 574.

- Rocha-Aride, P. H., Roubach, R. e Val, A. (2007). Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. 35, 24-27.
- Rüchel, R., Tegeler, R. e Trost, M. (1982). A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20, 233-244.
- Sá, S. R., Junior, A. G. S., Lima-Neto, R. G., Andrade, C. A. e Oliveira, M. D. (2020). Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species. *Talanta*, 220, 121375.
- Sajeewan, T.P., Philip, R. e Singh, I.S. B. (2006). Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*, *Aquaculture*, 257, 150-155.
- Santos, D. K. F., Meira, H.M., Rufino, R. D., Luna, J. M. e Sarubbo, L.A. (2017). Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent, *Process Biochemistry*, 54, 20-27.
- Santos, L. e Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52 (2), 135-143.
- Sharma, Y., Chumber, S. K. e Kaur, M. (2017). Studying the Prevalence, Species Distribution, and Detection of In vitro Production of Phospholipase from *Candida* Isolated from Cases of Invasive Candidiasis. *Journal of global infectious diseases* 9, 8–11.
- Sharma, A., Ahluwalia, O., Tripathi, A. D., Singh, G. e Arya, S. K. (2020). Phytases and their pharmaceutical applications: Mini-review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 2020, 101439, 1878-8181.
- Skinner, C. E. e Fletcher, D. W. (1960). A review of the genus *Candida*. *Bacteriological Reviews*, 24(4), 397-416.
- Sidrim, J. J. C., Maia, D. C. B. S. C., Brilhante, R. S. N., Soares, G. D. P., Cordeiro, R. A., Monteiro, A. J. e Rocha, M. F. G. (2010). *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology* 145, 324-328.
- Tavares-Dias, M., Araújo, C.S.O., Porto, S.M.A., Viana, G.M. e Monteiro, P.C. (2013). Sanidade do tambaqui *colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem, Embrapa Amapá; Manaus: Universidade Nilton Lins, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2013 ISSN 1517-4859.
- Tong, Y. e Tang, J. (2017). *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiological Research* 198, 27-35, ISSN 0944-5013.
- Tsang, P.W.K. (2011). Differential Phytate Utilization in *Candida* species. *Mycopathologia* 172, 473–479.
- Tsuboi R., Komatsuzaki H. e Ogawa H. (1996). Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun*. Aug;64 2936-2940.
- Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A. L., Janine Sherrier, D., & Bais, H. P. (2015). A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 242(4), 1037-1050.
- Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36, 223-228.
- Zarnowski, R., Noll, A., Chevrette, M.G., Sanchez, H., Jones, R., Anhalt, H., Fossen, J., Jaromin, A., Currie, C., Nett, J.E., Mitchell, A. e Andes, D.R. (2021). Coordination of fungal biofilm development by extracellular vesicle cargo. *Nat Commun*, 12:6235.