



Original

Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos

Sandra E. Hernández-Solís^{a,*}, Florencio Rueda-Gordillo^a y Rafael A. Rojas-Herrera^b^a Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México^b Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de diciembre de 2012

Aceptado el 2 de septiembre de 2013

On-line el 23 de septiembre de 2013

Palabras clave:

Candida albicans

Proteinasa

Factores de virulencia

Portadores sanos

Diabetes

Virus de la inmunodeficiencia humana

Cáncer

Candidiasis oral

R E S U M E N

Antecedentes: *Candida albicans* posee una variedad de factores de virulencia, entre los que se encuentran las enzimas aspartil proteinasas, que constituyen un factor determinante en la patogénesis de esta levadura en pacientes inmunodeprimidos.

Objetivos: El propósito de este estudio fue determinar la actividad de la proteinasa de cepas de *C. albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos con cáncer, diabéticos y seropositivos a VIH, con candidiasis oral y sujetos sanos.

Métodos: Se analizaron 250 cepas de *C. albicans* distribuidas en 5 grupos diferentes: pacientes con cáncer, diabéticos, seropositivos a VIH, con candidiasis oral y sujetos sanos.

Resultados: El 46% de las cepas provenientes de pacientes con cáncer, el 54% de VIH, el 60% de diabéticos, el 70% de candidiasis oral y el 42% de sujetos sanos presentaron actividad proteolítica. Las cepas de los pacientes inmunodeprimidos y con candidiasis oral presentaron una mayor actividad proteolítica que las de los sujetos sanos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de candidiasis-sanos, candidiasis-VIH y diabéticos-sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de los pacientes con candidiasis oral, diabéticos y con cáncer; tampoco entre los pacientes diabéticos y con VIH, ni entre los pacientes con cáncer, VIH y sujetos sanos.

Conclusiones: Con estos hallazgos se puede inferir que a pesar de que las enzimas aspartil proteinasas juegan un papel importante en la patogénesis de *C. albicans*, su actividad depende de las condiciones del huésped.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Proteinase activity in *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients, with oral candidiasis and in healthy subjects

A B S T R A C T

Background: *Candida albicans* has a variety of virulence factors, including secreted aspartyl proteases, which are determinant factors in the pathogenesis of this yeast in immunocompromised patients.

Aims: Proteinase activity was identified in *C. albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients with cancer, diabetes and HIV+, with oral candidiasis and in healthy subjects.

Methods: Two hundred and fifty *C. albicans* strains were analyzed, distributed in 5 different groups: patients with cancer, diabetes, HIV+, with oral candidiasis and healthy subjects.

Results: Proteolytic activity was identified in 46% of the strains from cancer patients, 54% from HIV+ patients, 60% from diabetics, 70% from oral candidiasis patients, and 42% from healthy subjects. Activity was higher in strains from immunocompromised and oral candidiasis patients than in healthy subjects. Differences were observed between the candidiasis-healthy, candidiasis-HIV+, and diabetic-healthy groups. No differences were observed between the oral candidiasis, diabetes and cancer patients, between the diabetes and HIV+ patients, or between the cancer patients, HIV+ patients and healthy subjects.

Conclusions: The present results suggest that although secreted aspartyl proteases are important in the pathogenesis of *C. albicans*, their activity depends on host conditions.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Candida albicans

Proteinase

Virulence factors

Healthy carriers

Diabetes

Human immunodeficiency virus

Cancer

Oral candidiasis

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: hsolis@uady.mx (S.E. Hernández-Solís).

Las especies del género *Candida* son patógenos oportunistas que viven como comensales en la cavidad oral en una proporción significativa de sujetos sanos². Las razones de su existencia como parte de la microbiota de las personas sanas son todavía desconocidas⁴.

Ciertos factores favorecen la colonización oral por especies de *Candida* y el desarrollo de la infección oportunista llamada candidiasis oral, siendo *Candida albicans* la especie más prevalente de todas; sin embargo, otras especies, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*, han mostrado recientemente una mayor importancia con relación a esta enfermedad^{26,27}. Entre los factores predisponentes para la colonización por *Candida* se encuentran la hospitalización, las disfunciones metabólicas, las interacciones con la microbiota bacteriana, el sida, el cáncer, la diabetes, la leucemia, la edad (niños y ancianos), la utilización de antibióticos de amplio espectro y el tratamiento quimioterápico, entre otros. Estos factores contribuyen al incremento de las infecciones por este microorganismo a nivel mundial, facilitando la conversión de *Candida* de la forma comensal a la patógena^{4,7,15,19,23,24,28}.

Por otro lado, también se ha visto que diversos factores de virulencia de *Candida* contribuyen a su patogenicidad, incluyendo la capacidad para adherirse a células epiteliales y biomateriales, la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como las aspartil proteinasas secretorias (Saps) y las fosfolipasas (PL), y la producción de hemolisinas^{6,20}.

Las Saps son una familia de enzimas capaces de degradar diversos tipos de sustratos fisiológicamente importantes, entre los que se encuentran componentes celulares de las mucosas y elementos del sistema inmune^{6,20}. Estudios experimentales han demostrado que la elevada producción de Saps por *C. albicans* mejora la capacidad del microorganismo para colonizar y penetrar tejidos y evadir el sistema inmune del huésped^{5,6,19}.

El presente estudio compara la expresión *in vitro* de las Saps en cepas de *C. albicans* aisladas de 5 grupos diferentes: 1) sujetos sanos; 2) diabéticos; 3) portadores de VIH; 4) pacientes con cáncer, y 5) pacientes con candidiasis oral.

Materiales y métodos

Sujetos de estudio

Doscientas cincuenta cepas de *C. albicans* fueron obtenidas de igual número de pacientes residentes en la ciudad de Mérida, Yucatán, México; todos los sujetos participaron de manera voluntaria en este estudio, distribuidos en 5 grupos de 50 pacientes cada uno: pacientes con VIH, con cáncer, diabéticos, con candidiasis oral y sujetos sanos. A excepción de los pacientes que presentaron candidiasis bucal, el resto eran portadores asintomáticos de *C. albicans*. Todos los pacientes con candidiasis oral fueron diagnosticados de candidiasis pseudomembranosa, según los criterios descritos por McCullough y Savage¹⁶.

Toma de muestra y aislamiento e identificación de *Candida albicans*

Las muestras fueron recogidas con un hisopo estéril que se frotó rotatoriamente sobre la mucosa oral y el dorso de la lengua de cada uno de los pacientes, y procesadas en un tiempo máximo de 2 h después de la toma en el Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán. Todas las muestras fueron cultivadas en agar dextrosa Sabouraud (Difco®) en condiciones aerobias a 37 °C durante 48 h. Posteriormente, los aislamientos obtenidos fueron presuntivamente identificados por la coloración verde de las colonias sobre el medio de cultivo CHROMagar® *Candida* (BBL,

Becton, Dickinson and Company), incubado en condiciones aerobias durante 48 h a 37 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante⁹.

Identificación molecular

La extracción del ADN de las levaduras se realizó por el método de extracción rápida de ebullición-congelamiento, descrito previamente⁸.

La identificación molecular de las cepas aisladas se llevó a cabo por el método de PCR múltiple, según el procedimiento descrito previamente por Yang et al.³¹. Se utilizó un par de oligonucleótidos específicos para la especie *C. albicans* que amplifican un fragmento de 175 pb del gen 25S ARNr, denominados: CAL5 (5'-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG-3') y NL4CAL (5'-AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTA/TAA-3'), y el par de oligonucleótidos RNAF (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y RNAR (5'-GGTCCGTGTTCAAGACG-3') que amplifican un fragmento de 610 pb del gen 25S ARNr del género *Candida*, que también sirvió como control positivo.

La mezcla de reacción de PCR se preparó con 0,8 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 2,5 mM de MgCl₂, tampón PCR (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de KCl), 0,2 mM de la mezcla de dNTP, 2,5 U de Taq ADN polimerasa, 10 ng del ADN en estudio y agua destilada hasta completar 25 µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial a 95 °C durante 6 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C y 30 s a 72 °C, con una incubación final de 10 min a 72 °C^{25,31}.

Todos los productos de la PCR fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando el tampón TBE 1 X (Tris 1 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 0,01 M) a 100 V durante 1 h. Los geles fueron teñidos con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio durante 15 min. Posteriormente, las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV. El tamaño del fragmento del ADN amplificado fue determinado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb¹⁵. La cepa de *C. albicans* ATCC 10231 fue utilizada como control positivo.

Cuantificación de la actividad proteínica

Para determinar la actividad proteolítica se llevó a cabo la técnica descrita por Ozkan et al.²², que consistió en dejar crecer los cultivos de *C. albicans* durante toda la noche en el medio líquido Sabouraud a 36 °C y en agitación a 200 rpm en una incubadora orbital. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 10 min, se realizaron 2 lavados con solución de tampón fosfato (pH 7,2) y se resuspendieron hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 células/ml. Se colocaron 10 µl de la suspensión sobre el medio agar suero albúmina bovina (1% agar, 0,1% KH₂PO₄, 0,5% MgSO₄, 1% glucosa y 0,16% de albúmina sérica bovina, pH 5,0). Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 días y luego fueron fijadas con ácido tricloroacético al 20% y se tiñeron con amido black al 1,25%; la decoloración se realizó con ácido acético al 15%.

Se midieron los diámetros de las colonias y las zonas claras alrededor de cada una de ellas y los valores fueron usados para calcular el índice de actividad enzimática (Pz) siguiendo la metodología de Price et al., descrita por Oksuz et al.²¹. Los índices de Pz pueden tomar valores que van de 0 a 1; valores menores de 0,69 son considerados como de fuerte actividad, valores comprendidos entre 0,70 y 0,79 son considerados de actividad moderada, los que se encuentren entre 0,80 y 0,89 como una actividad débil, los que estén entre 0,9 y 0,99 son considerados como de actividad muy débil, y un valor igual a 1 se considera sin actividad. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en 2 ocasiones diferentes, usándose la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 como control positivo²¹.

Tabla 1
Distribución de las cepas de *Candida albicans* con actividad proteolítica y promedios de los diferentes grupos de pacientes

Grupos de estudio	Con actividad proteolítica, n (%)	Sin actividad proteolítica, n (%)	Media de Pz ± DE
Sanos	21 (42)	29 (58)	0,711 ± 0,146
Cáncer	23 (46)	27 (54)	0,648 ± 0,156
VIH+	27 (54)	23 (46)	0,659 ± 0,170
Diabéticos	30 (60)	20 (40)	0,579 ± 0,177
Candidiasis oral	35 (70)	15 (30)	0,574 ± 0,163
Total	136 (54)	114 (46)	

Análisis estadístico

La actividad proteínasa de cada grupo se comparó mediante la prueba del análisis de la varianza. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

La totalidad de las 250 cepas de *C. albicans* (50 de cada grupo) fueron identificadas por PCR. Del total de cepas estudiadas, 136 (54%) presentaron actividad proteolítica. La distribución de las cepas proteolíticas de *C. albicans* de cada grupo de pacientes se muestra en la tabla 1. Se encontró que el grupo de estudio con mayor porcentaje de cepas con actividad proteolítica fue el de candidiasis oral, con el 70% (35/50), y el de menor número de cepas con actividad proteolítica correspondió al grupo de pacientes sanos, con el 42% (21/50).

Las cepas de cada grupo de pacientes se clasificaron de acuerdo con sus índices de Pz, encontrándose que el 30% de las cepas de los pacientes con cáncer, el 26% de las de los pacientes con VIH, el 46% de las de los pacientes diabéticos, el 52% de las de los pacientes con candidiasis oral y el 16% de las de los sujetos sanos mostraron una alta actividad proteolítica, con valores de $Pz < 0,69$ (ver tabla 2).

El grupo con candidiasis oral fue el de mayor actividad, con un valor Pz promedio de 0,574, seguido del de pacientes diabéticos con 0,579, y el grupo con menor actividad proteolítica (sujetos sanos) con 0,711 (ver tabla 1). Se realizó la prueba estadística del análisis de la varianza para comparar los distintos grupos de pacientes, encontrándose que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la actividad proteolítica entre los grupos de candidiasis oral y sujetos sanos, el grupo de candidiasis oral y el de VIH+, y el grupo de diabéticos con el de sujetos sanos.

Discusión

La colonización por *C. albicans* puede llevar a la infección sistémica cuando el huésped presenta factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, sida, pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia o radioterapia, y sometidos a trasplante de órganos¹.

C. albicans es un microorganismo patógeno facultativo que ha desarrollado una serie de factores de virulencia entre los que se encuentran la secreción de Saps, que facilitan la invasión de los

tejidos y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped¹³. La secreción de Saps ha sido asociada a la patogenicidad de *C. albicans*, ya que cepas aisladas de pacientes con candidiasis bucal han mostrado mayor actividad proteolítica que las aisladas de la cavidad oral de portadores sanos¹¹.

Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la actividad proteolítica de cepas aisladas de diferentes grupos de pacientes^{1,10,12,13,21}. En México, no existen estudios publicados acerca de la actividad proteolítica de *C. albicans*. El presente trabajo se llevó a cabo para determinar la actividad *in vitro* de las Saps de cepas de *C. albicans* aisladas de 5 grupos de pacientes: pacientes con cáncer, con VIH, diabéticos, con candidiasis oral y sujetos sanos. Se encontró que el 46% de los pacientes con cáncer, el 54% de los pacientes con VIH, el 60% de los pacientes diabéticos, el 70% de los pacientes con candidiasis oral y el 42% de los pacientes sanos presentaron cepas de *C. albicans* con actividad proteolítica. Estudios similares han publicado que el 100% de las cepas provenientes de pacientes con VIH, cáncer¹⁰, diabetes³⁰ y con candidiasis oral⁶ presentaron actividad proteolítica; en sujetos sanos se ha publicado que el 50% de las cepas presenta dicha actividad²¹. Estas diferencias en los resultados probablemente se deban al tipo de infección presente en los sujetos de estudio y a las metodologías empleadas para determinar la actividad proteolítica. En este estudio, a excepción del grupo con candidiasis oral, todos los pacientes eran portadores sanos (ninguno presentó sintomatología de la enfermedad).

Al comparar los grupos de estudio de acuerdo con la actividad de la proteínasa, se observó que un mayor número de cepas (52%) de los pacientes con candidiasis oral presentaron una actividad proteolítica alta con respecto a los demás grupos de pacientes. De igual manera, al comparar la actividad de la proteínasa entre los diferentes grupos, se encontró que los pacientes con candidiasis oral, diabéticos, con cáncer y VIH presentaron una actividad alta con una media menor a 0,69 en comparación con los sujetos sanos, que presentaron una media de 0,711. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores, en donde se ha publicado que cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes inmunodeprimidos y con candidiasis oral presentan mayor actividad de la proteínasa que las de los sujetos sanos^{11,17,29}.

Al analizar la actividad proteolítica entre los diferentes grupos, se observó que aquel con candidiasis oral presentó mayor actividad, con una media de 0,574, y una diferencia estadísticamente significativa entre este grupo de pacientes y aquellos con VIH y los sujetos sanos, que presentaron una media de 0,659 y 0,711,

Tabla 2
Distribución de la actividad proteínasa de acuerdo con los índices de actividad enzimática de las cepas de *Candida albicans* de los diferentes grupos de estudio

Valor Pz	Grupos de estudio									
	Cáncer		VIH+		Diabéticos		Candidiasis oral		Sanos	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1,00	27	54	23	46	20	40	15	30	29	58
0,9-0,99	1	2	1	2	0	0	0	0	2	4
0,8-0,89	4	8	4	8	5	10	4	8	5	10
0,7-0,79	3	6	9	18	2	4	5	10	6	12
<0,69	15	30	13	26	23	46	26	52	8	16

respectivamente. El mismo resultado se obtuvo al comparar la actividad proteolítica de las cepas de los pacientes diabéticos (0,579) con la de los sujetos sanos. Un estudio realizado por Tsang et al. señala que las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes diabéticos mostraron una mayor actividad proteolítica que las cepas aisladas de sujetos sanos, y menciona que esta actividad podría estar relacionada con características propias de estos pacientes, como el pH ácido y la reducción del flujo salival³⁰. Por el contrario, Manfredi et al. no encontraron diferencias entre las cepas aisladas de pacientes diabéticos y sujetos sanos, sin embargo, concluyen que en pacientes diabéticos, parece ser que la diabetes mellitus podría influir en el mejoramiento de la expresión de los factores de virulencia de *C. albicans*¹². Por otro lado, nosotros no encontramos diferencias en la actividad de la proteinasa entre las cepas de los pacientes con candidiasis oral, diabéticos y con cáncer; tampoco entre los pacientes diabéticos y con VIH, ni entre los pacientes con cáncer, VIH y sujetos sanos. La patogenicidad de *C. albicans*, además de a sus factores de virulencia, está asociada al estado inmunitario del huésped²⁹. Se cree que los factores dependientes del huésped tienen suma importancia en la patogenicidad de esta levadura, y que causa la enfermedad cuando las defensas del huésped se encuentran debilitadas³. La virulencia de *C. albicans* no está asociada a un solo factor de virulencia, sino a la combinación de ellos, como son los fosfolípidos, la producción de biofilm, las hemolisinas, etc.¹⁸. De acuerdo con lo anterior, se evidencia que la patogenicidad de *C. albicans* es un fenómeno complejo que incluye la colonización, la adhesión, la invasión y el daño a las células del huésped, la composición de la pared celular de *Candida* y la producción por esta levadura de toxinas y enzimas proteolíticas; pero estos factores pueden variar según las condiciones de los grupos de estudio, las características del microorganismo y las condiciones ambientales que rodean al huésped¹⁴.

Por todo esto, consideramos que sería importante llevar a cabo estudios de expresión genética para conocer el comportamiento de los genes SAP presentes en estos grupos de pacientes, con el fin de ampliar el conocimiento acerca del papel que juegan las Saps en la patogenicidad de *C. albicans*.

Por lo tanto, se concluye que la patogenicidad de *C. albicans* no depende únicamente de la producción de las Saps, sino también del estado inmunológico del huésped.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Al-Abaid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: Prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57:279-84.
- Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol.* 2008;53:1172-8.
- Beiro FR, Vidal GI, Vidal GMC, Orgeira PJ. Factores predisponentes sistémicos de la candidiasis oral. *Medicina General.* 2002;41:121-5.
- Boriollo MF, Bassi RC, dos Santos Nascimento CM, Feliciano LM, Francisco SB, Barros LM, et al. Distribution and hydrolytic enzyme characteristics of *Candida albicans* strains isolated from diabetic patients and their non-diabetic consorts. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:437-50.
- Costa CR, Jesuino RS, de Aquino Lemos J, de Fátima Lisboa Fernandes O, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia.* 2010;169:91-8.
- Da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: Quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia.* 2009;167:73-9.

- De Azevedo Izidoro AC, Semprebom AM, Baboni FB, Rosa RT, Machado MA, Samaranayake LP, et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. *Arch Oral Biol.* 2012;57:148-53.
- De Baere T, Claeys G, Swinne D, Verschraegen G, Muylaert A, Massonet C, et al. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol.* 2002;2:21.
- Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia.* 2008;166:209-17.
- Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006;161:213-8.
- Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:405-7.
- Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:183-9.
- Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindos G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses.* 2011;54:e10-6.
- Mardegan RC, Klein MI, Golvea MB, Rodrigues JAO, Gonçalves RB, Höfling JF. Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. *Braz J Microbiol.* 2006;37:26-32.
- Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Gonçalves V, Seabra A, et al. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27:119-24.
- McCullough MJ, Savage NW. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Aust Dent J.* 2005;50 4 Suppl 2:S36-9.
- Menezes EA, Augusto KL, Freire CCF, Cunha FA, Montenegro RM, Montenegro Jr RM. Freqüência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43:241-4.
- Mohandas V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:208-10.
- Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in southern India. *J Glob Infect Dis.* 2011;3:4-8.
- Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia.* 2010;169:269-78.
- Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:280-3.
- Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:319-23.
- Patel M, Shackleton JT, Coogan MM. Effect of antifungal treatment on the prevalence of yeasts in HIV-infected subjects. *J Med Microbiol.* 2006;55:1279-84.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133-63.
- Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J Clin Microbiol.* 2000;38:170-4.
- Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4159-62.
- Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:83-92.
- Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:264-72.
- Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4726-34.
- Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007;56:1393-8.
- Yang CW, Barkham TM, Chan FY, Wang Y. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2003;41:472-4.