

SELEÇÃO E INDUÇÃO DE MUTANTES COM HETERORESISTÊNCIA À FLUCONAZOL EM *Candida albicans*

**Josimary M. V. OLIVEIRA¹; Derick E.M.TASSIN²; Gabriel E.S AMORIN³; Amanda
L. T. DIAS⁴; Daniela C. M. VIEIRA⁵; Marília C.F. ARIOSAS⁶**

RESUMO

Espécies de *Candida* habitam o corpo humano, não causam doenças em organismos considerados saudáveis, entretanto podem levar a infecções graves quando estes apresentam alterações nos mecanismos de defesa ou ocorre comprometimento de barreiras anatômicas. O objetivo do presente estudo foi obter amostras heteroresistentes ao fluconazol usando dois métodos distintos: indução e seleção. Foram utilizados cinco isolados de *Candida albicans*, sendo quatro provenientes de amostras clínicas e uma cepa padrão. Selecionou-se amostras heteroresistentes através da pressão seletiva, utilizando meio adicionado de fluconazol (8µg/mL). Paralelamente, as amostras selvagens foram submetidas à indução de resistência através do cultivo em concentrações crescentes de fluconazol (16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256 µg/mL). Foi obtida uma amostra dose-dependente e uma resistente ao fluconazol por seleção e uma amostra resistente por indução. Cepas heteroresistentes ao fluconazol podem ser obtidas ou não com exposição prévia a este antifúngico.

Palavras-chave: *albicans*; Amostras; Resistência

1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são considerados patógenos oportunistas, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada.

Antimicóticos da classe dos azóis são os mais prescritos para prevenção e tratamentos de candidíases, sendo o fluconazol, o representante mais utilizado. *Candida albicans* durante muito tempo permaneceu amplamente como espécie sensível ao fluconazol, mas recentemente tem sido documentado o desenvolvimento de resistência em alguns centros de saúde e, também, falhas na terapêutica clínica (EDDOUZI et al., 2013)

Heteroresistência é a expressão de diferentes perfis de resistência em subpopulações de uma estirpe. A presença de droga pode influenciar a transcrição de genes de resistência dentro de uma população clonal de célula (CLAUDINO, 2007). A exposição de cepas de leveduras sensíveis por períodos prolongados, a baixas concentrações dos antifúngicos sistêmicos, em

- 1 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: josimv@hotmail.com
- 2 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: derickmodena@gmail.com
- 3 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: gabriel_amorim7@hotmail.com
- 4 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: danicmvieira@yahoo.com.br
- 5 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: amandaldias@gmail.com
- 6 Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG E-mail: mariliaariosa@gmail.com

pacientes hospitalizados pode levar à seleção de isolados resistentes a estes medicamentos (FERREIRA, 2011). Assim, é de fundamental importância o esclarecimento das condições que possam influenciar a persistência de células fúngicas no hospedeiro. Uma investigação a nível molecular, acerca de como é a atividade de cepas sensíveis diante de pressões ambientais, pode colaborar no entendimento dos mecanismos de resistência antifúngica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

CEPAS

As amostras utilizadas neste projeto são pertencentes à Micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL – MG. Foram usados cinco isolados clínicos de *Candida albicans* e uma cepa-padrão da American Type Culture Collection (ATCC), *C. albicans* (ATCC 10231).

TESTE DE SENSIBILIDADE

A suscetibilidade ao antifúngico fluconazol foi inicialmente verificada pelo Etest de acordo com o método M44-A-difusão em disco do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Suscetibilidade ao fluconazol também foi avaliada pelo método de microdiluição, tal como recomendado pelo CLSI, documento M27A.

SELEÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA

O teste foi realizado com base na metodologia empregada por Xu et al. (2001) com modificações. A capacidade de crescimento na presença de antifúngico foi avaliada em 2 fases: triagem e seleção de fenótipos resistentes a droga.

Fase de triagem: Depois do cultivo de 24 horas em meio ágar Sabouraud a 37°C, amostras de *C. albicans* foram inoculadas em dois tubos contendo solução salina com concentrações finais de inóculo de 10^4 e 10^7 UFC/mL para cada cepa. Com auxílio de *swab* estéril a suspensão das leveduras foi inoculada por toda a superfície da placa de ágar batata adicionado de fluconazol (8 µg/mL). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. As amostras que não apresentaram crescimento na presença de fluconazol foram utilizadas na fase de seleção descrita a seguir.

Fase de seleção: As amostras selecionadas para esta fase foram aquelas que não cresceram na fase de triagem e foram repicadas em ágar Sabouraud por 24 h. Com auxílio de *swab* descartável

estéril, as leveduras foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) e incubadas a temperatura de 37°C. Após 24 h, os tubos foram centrifugados (4.000 rpm por 5 minutos) e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril. As células foram suspensas em solução salina (10^9 UFC/mL) e então aferido a concentração por espectrofotometria. A suspensão foi vertida na superfície do meio ágar batata acrescido de 8 µg/mL de fluconazol. Três a quatro colônias das amostras que apresentaram crescimento visível, foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas em meio ágar Sabouraud para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

INDUÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA

Foram utilizadas as três amostras que apresentaram crescimento na presença de fluconazol (8,0 µg/mL), na fase de triagem. Depois do cultivo de 24 h em ágar Sabouraud a 35°C as amostras foram repicadas em placas de Petri com meio ágar batata contendo 8,0 µg de fluconazol por mL e incubado por até 48 h. Depois foram feitos repiques sucessivos de até 48 h para placas de Petri com meio ágar batata, adicionado de fluconazol nas concentrações de 16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256 µg/mL. Colônias que apresentaram crescimento nos meios contendo a maior concentração do antifúngico foram submetidas a testes de sensibilidade ao fluconazol.

3. RESULTDOS E DISCUSSÕES

SELEÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA

Fase de triagem: Na fase de triagem, todas as 5 amostras foram inoculadas em meio ágar batata acrescido de fluconazol (8µg/mL) e 2 não apresentaram crescimento. Essas, então, foram utilizadas para o teste de seleção de mutantes resistentes ao fluconazol.

Seleção: Depois do cultivo em caldo YEPD as amostras selvagens apresentaram crescimento visível em placas de Petri contendo ágar batata acrescido de fluconazol (8µg/mL) com suspensões da ordem de 10^9 ufc/mL. As cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade ao fluconazol, segundo o método proposto pelo E-test. Os resultados das CIMs foram comparados aos resultados obtidos com as mesmas cepas antes do teste de crescimento na presença de fluconazol. A Tabela 1 apresenta os resultados dos testes de sensibilidade antes e após a seleção.

Tabela 1: Suscetibilidade ao fluconazol de cepas de *Candida albicans* antes e após a seleção

| Cepas | CIM inicial/ CIM final ($\mu\text{g/mL}$) Etest | |
|-------|---|------------|
| | Fluconazol | |
| | Antes | Depois |
| 121 | 1,5 | 16 |
| 257 | 0,38 | Resistente |

INDUÇÃO DE FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA

As três amostras que foram selecionadas para o teste de indução apresentaram crescimento em todas as concentrações de fluconazol (16,0; 32,0; 64,0; 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$). Tais cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade, segundo o método proposto pelo CLSI. Os resultados das CIMs foram comparados aos resultados obtidos com as mesmas cepas antes da indução de crescimento na presença de fluconazol. Resultados mostrados na tabela 2:

Tabela 2: Suscetibilidade ao fluconazol de cepas de *Candida albicans* antes e após a indução

| Cepas | CIM inicial/ CIM final ($\mu\text{g/mL}$) Microdiluição (CLSI) | |
|-------|--|------------|
| | Fluconazol | |
| | Antes | Depois |
| 31 | 4,0 | Resistente |
| 220 | 4,0 | 8,0 |
| 10231 | 8,0 | 8,0 |

4. CONCLUSÕES

Cepas heteroresistentes ao fluconazol podem ser obtidas ou não com exposição prévia a este antifúngico. Esses resultados sugerem que o fenótipo de heteroresistência a esse antimicótico pode ser obtido pelos dois métodos estudados, seleção e indução.

REFERÊNCIAS

CLAUDINO, A. L. R. **Caracterização de isolados de *Candida spp.* de cavidade bucal quanto aos aspectos fenotípicos e moleculares e obtenção de mutantes heteroresistentes à anfotericina B e fluconazol.** Universidade Federal de Alfenas. 2007.

EDDOUZI, J. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

FERREIRA, A. V. **Comparação do perfil associado à virulência e da sensibilidade antifúngica entre amostras de *Candidas spp.* em casos de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar.** Universidade Federal de Alfenas. 2011.

XU, J. et al. Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 420-427, Fev. 2001.