

## ESTUDO DAS LEVEDUROSES NAS NEOPLASIAS MALIGNAS: EFEITO *IN VITRO* DE FLUCONAZOL E ANIDULAFUNGINA EM BIOFILMES FORMADOS POR *Candida parapsilosis*

José Monteiro dos Santos Filho<sup>1</sup>; Rejane Pereira Neves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Odontologia- CCS – UFPE; E-mail: santosfilho.jm@gmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Micologia – CCB – UFPE. E-mail: rejadel@yahoo.com.br

**Sumário:** As leveduroses constituem uma condição clínica desfavorável. Causada por diversas espécies de leveduras representam a quarta causa mais comum de infecções oportunistas, constituindo uma atribuível mortalidade em até 75% dos casos, sobretudo em portadores de câncer, que são submetidos a tratamentos como radioterapia e quimioterapia. Embora fundamentais, esses tratamentos afetam o sistema imunológico, propiciando o desenvolvimento das infecções. Espécies de *Candida* têm sido os agentes mais comuns de infecções invasivas, estando relacionadas em algumas circunstâncias com intervenções médicas específicas. Assim, por fazer parte da microbiota humana, qualquer variável que cause desequilíbrio pode resultar na translocação destas leveduras até os capilares com posterior disseminação. O presente trabalho tem objetivo de analisar a ação de antifúngicos em biofilmes gerados por *Candida parapsilosis*. Para esse fim, foram realizados cultivos em discos de silicone dispostos em microplacas de titulação para a produção de biofilmes, testes de sensibilidade antifúngica ao fluconazol e anidulafungina a fim de descobrir a concentração mínima de inibição do crescimento de células planquitônicas e o tratamento dos biofilmes formados. A partir dos métodos realizados, obteve-se inibição no crescimento fúngico e da produção do biofilme, demonstrando a eficácia das substâncias selecionadas para o tratamento das candidemias.

**Palavras-chave:** antifúngico; biofilme; infecção; inibição.

### INTRODUÇÃO

As leveduroses, condição clínica desfavorável causada por diversas espécies de leveduras representam a quarta causa mais comum de infecções oportunistas, constituindo uma atribuível mortalidade em até 75% dos casos, sobretudo em portadores de câncer (Molina et al., 2012). Tratamentos como radioterapia e quimioterapia, instituídos para o câncer, embora de extrema importância, conduzem alteração no sistema imunológico propiciando o desenvolvimento das infecções por leveduras, sobretudo pertencentes ao gênero *Candida* (Clancy; Nguyen, 2013). Espécies de *Candida* têm sido os agentes mais comuns de infecções invasivas, estando relacionadas em algumas circunstâncias com intervenções médicas específicas, profilaxia antifúngica, utilização de dispositivos médicos invasivos além da permanência hospitalar prolongada por condições clínicas de base a exemplo das neoplasias. Assim, por fazer parte da microbiota humana, qualquer variável que cause desequilíbrio pode resultar na translocação destas leveduras até os capilares com posterior disseminação (Pemán et al., 2012). Neste sentido, as alterações no sistema imunológico com a radioterapia e quimioterapia, têm conduzido fortemente ao desenvolvimento das leveduroses (Sifuentes-Osornio et al., 2012). A exposição aos fatores de risco das leveduroses deve ser controlada, especialmente em pacientes que não respondem ao tratamento em virtude de cepas resistentes (HEBERT et al., 2010). Para esse fim, o estudo dos biofilmes formados pelas leveduras pode melhorar o cenário atual e conduzir a perspectivas futuras interessante. Tais estruturas constituem agregados unicelulares que geram estruturas multicelulares as quais podem se aderir a superfícies variadas como

dispositivos médicos (DOUGLAS, 2003; RUIZ et al., 2013). Assim, este trabalho fundamenta-se em pesquisas que busquem estratégias que contribuam para minimizar o agravamento dos quadros clínicos de candidíases por *C. parapsilosis* em pacientes com neoplasias malignas e possibilite a diminuição do tempo de internamento hospitalar.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidos cepas de *C. parapsilosis* recém isoladas de amostras clínicas de pacientes com neoplasias malignas, estocadas na Micoteca URM e mantidas em óleo mineral (Sherf, 1943). A reativação das culturas, foi feita retirando-se fragmentos das mesmas e transferido-os para caldo glicosado e incubados a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento, foram transferidas para placas de Petri contendo meio para verificação da viabilidade. Todas as culturas de *C. parapsilosis* foram revisadas taxonomicamente através dos critérios clássicos, segundo Barnett et al. (2000) e Hoog et al. (2000), avaliando-se a forma das células vegetativas através de lâminas contendo fragmentos da cultura corados com azul de Aman (lactofenol blue) e observadas quanto às diferentes morfologias (esferoidais, subglobulosa, elipsoidal, ovóide, cilíndrica, botuliforme, alongada, apiculada, ogival ou lunata); a formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporos, utilizando a técnica de Dalmau (1929), na qual 3 mL de Ágar fubá (CornMeal agar) foram depositados em lâmina contida sobre um suporte de vidro em forma de U dentro de uma placa de Petri, após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo-se duas estrias paralelas, posteriormente recobertas com lamínula esterilizada, a visualização das estruturas através de microscopia será realizou-se após 24h, 48h e 72h.

Os ensaios para formação do biofilme foram procedidos de acordo com Vandenbosch et al. (2010). As culturas de *C. parapsilosis* foram cultivadas em discos de silicone estéreis (4 mm de espessura e 13 mm de diâmetro) em placa de microtitulação de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). Para o preparo dos inóculos os isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose por 16h à  $37^{\circ}\text{C}$ , em seguida centrifugados e removidos o sobrenadante para lavagem das células com solução salina a 0,9% (três vezes). Estas foram ressuspensas em 1 mL de 0,9% de NaCl (Novolab, Geraardsbergen, Bélgica) e o posteriormente o inóculo foi diluído em YNB 0,1X (Yeast Nitrogen Base, BD, Franklin Lakes, EUA) suplementado com 5 mM de glicose (Sigma-Aldrich) para se obter uma densidade óptica de 0,07 a um comprimento de onda de 600 nm. Ainda, 1 mL de uma diluição de 1:100 do inóculo em YNB 0,1X foi adicionado a cada poço contendo um disco de silicone. As placas de microtitulação foram incubadas durante 1h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida os discos de silicone foram lavados (três vezes) com 1 mL de 0,9% de NaCl para remover as células não aderidas e asépticamente transferido para um novo poço. Foi adicionado 1mL de YNB diluído (0,004X com uma concentração final de glicose de 0,2 mM) e as placas foram incubadas durante 24h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os tratamentos dos biofilmes com antifúngicos foi procedido de acordo com Vandenbosch et al. (2010). Os discos de silicone com os biofilmes maduros foram transferidos para uma placa de microtitulação de 24 poços. Em seguida, 1 mL de uma solução em PBS com 2% de DMSO (Sigma-Aldrich) e os antifúngicos em concentrações anteriormente determinadas (CLSI, 2008), foram adicionados aos biofilmes e as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Após a incubação, os discos de silicone foram lavados três vezes com 1 mL de NaCl 0,9%. O número de UFC em cada disco de silicone foi determinado por plaqueamento do fluido. Dez diluições seriadas da suspensão de células resultante foram realizadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueado em SDA. As placas foram incubadas durante 24 h à  $37^{\circ}\text{C}$ .

### RESULTADOS

Das culturas de leveduras obtidas de diferentes substratos, oito foram reativadas no período de 15 dias oito e se mantiveram viáveis. As colônias apresentaram crescimento rápido, coloração variando de branco a creme, aspecto cremoso e alguns isolados com bordos regulares. As células variaram de ovais a elípticas, apresentando micélio verdadeiro artrosporado e pseudomicélio. Dos isolados estudados, 87% foram capazes de produzir biofilmes sob as condições estabelecidas. Houve crescimento fúngico em todos os poços na placa de microtitulação, porém a aderência foi positiva em 7 dos 8 isolados testados. Nos testes de sensibilidade antifúngica, quando submetidos a uma concentração maior que 1 µg/mL de fluconazol, observou-se inibição no crescimento fúngico em 80% dos isolados. No tratamento dos biofilmes formados, foram necessárias concentrações maiores ou iguais a 2 mg/mL para inibição de sua formação. Em relação à anidulafungina, a concentração mínima de inibição de células variou de 2 a 8 µg/mL.

### DISCUSSÃO

Culturas de fungos podem ser mantidas viáveis durante anos e a estocagem em óleo mineral previne a desidratação e diminui a atividade metabólica e o crescimento devido à baixa disponibilidade de oxigênio. As características das espécies que foram observadas em todos os isolados, apresentaram-se macroscopicamente iguais as descritas por BARNETT et al. (2000) em relação à cor das colônias, aspecto, bordo e microscopicamente morfologia das células, tipo de brotação, formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e a fisiologia para assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais ao desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (TAMURA et al., 2007). Constituem um dos fatores de virulência das espécies de *Candida sp*, conferindo resistência significativa à terapia antifúngica controlando a penetração das substâncias através da matriz de células de defesa do hospedeiro (RODRIGUES, T. J. S., 2013). Diversos tipos de antifúngicos podem ser usados nos tratamentos das leveduroses, porém é necessário conhecer qual a concentração mínima da substância capaz de inibir o crescimento microbiano. Pierce et al. (2008) realizaram uma análise da suscetibilidade dos biofilmes de isolados de *Candida*, os quais observaram que os valores da concentração mínima de inibição de 50% dos isolados testados era maior ou igual a 1.024 µg/mL para o fluconazol. A anidulafungina possui uma atividade fungicida eficiente contra espécies de *Candida*, além de possuir uma importante característica farmacocinética, pois é degradada lentamente no plasma humano através de processos de biotransformação ao invés de ser metabolizada. (Denning, D.W,2003).

### CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados, foi possível concluir que os biofilmes formados por *C. parapsilosis* foram sensíveis à ação dos antifúngicos Fluconazol e Anidulafungina, sendo essa última uma nova alternativa de uso, evitando os efeitos colaterais que podem ocorrer devido ao uso do Fluconazol. Tornam-se necessários mais estudos em relação à pesquisa de novos fármacos que possam combater as infecções fúngicas originadas secundariamente a outras doenças.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Propesq/Cnpq, aos professores e alunos do laboratório de Micologia Médica da UFPE, aos funcionários do departamento de Micologia do CCB.

### REFERÊNCIAS

Barnett, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge, Cambridge University Press.

Denning, D W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*; 362:1142–51.

Rodrigues, T. J. S, 2013. Cepas do complexo *Candida parapsilosis* de origem animal: classificação taxonômica, sensibilidade antifúngica e atributos de virulência in vitro. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

Tamura, N. Fatores de virulência de *Candida spp* isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, p.91-93, 2007.