

ANÁLISE DA IDENTIDADE MOLECULAR DE CEPAS SELVAGENS E MUTANTES DE *CANDIDA* RESISTENTES A FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B.

Rafael F. P. Júnior¹; André L. R. Claudino¹; Juliana Lyon²; Jorge K. Chavasco¹; Marília C. Franco¹

¹Universidade Federal Alfenas, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos

²Universidade do Vale do Paraíba; Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Resumo- O presente trabalho teve como objetivo selecionar cepas mutantes com fenótipo de resistência cruzada entre anfotericina B e fluconazol e também avaliar a identidade molecular das mesmas. Foram utilizadas metodologias de seleção e indução para a obtenção de mutantes heteroresistentes e as amostras foram geneticamente seqüenciadas. Foi possível obter apenas uma amostra resistente ao fluconazol.

Palavras-chave: *Candida*, mutantes, resistência.

Área do Conhecimento: Saúde

Introdução

Leveduras do gênero *Candida* podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que se manifestam clinicamente por lesões superficiais da pele e mucosas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. O constante e inadequado uso de antimicóticos tem levado à seleção de isolados resistentes, tornando essas drogas ineficientes. Alguns estudos que procuram entender esta resistência necessitam de obtenção de mutantes a partir de cepas originalmente sensíveis.

Visto a importância do tratamento dessa enfermidade e levando em consideração a possível ocorrência de cepas resistentes a antifúngicos, este trabalho teve como objetivo selecionar cepas mutantes com fenótipo de resistência cruzada entre anfotericina B e fluconazol e também avaliar a identidade molecular das mesmas.

Metodologia

Foram avaliados 30 isolados de *Candida* da micoteca do Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolf Lutz, provenientes de pacientes HIV negativos e HIV positivos com candidíase eritomatose bucal.

Foi realizada a seleção de cepas mutantes com resistência cruzada entre anfotericina B e fluconazol com base na metodologia empregada por Xu et al (2001). A capacidade de crescimento na presença de antifúngico foi avaliada em 2 fases: triagem e seleção de fenótipos resistentes à droga. Foi utilizado meio de cultura Agar batata,

contendo 8µg/mL de fluconazol e Agar RPMI, acrescido de 1,0µg/mL de anfotericina B.

O perfil de sensibilidade foi obtido através do método comercial Etest, com finalidade de correlacionar os valores encontrados nas cepas selvagens e mutantes.

A região ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada por PCR e utilizada para realização da clonagem gênica. Confirmado o tamanho do produto de PCR de cada cepa, esses foram purificados com ilustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE Healthcare. Os produtos de PCR purificados foram clonados utilizando o Kit p-GEM-T Easy Vector System I da Promega (A1360) conforme recomendação do fabricante. O método utilizado para preparação e transformação das células quimiocompetentes foi o mesmo descrito por Sambrook et al, 2001. Os plasmídeos foram extraídos utilizando-se Kit de extração GeneJet™ Plasmid Miniprep da Fermentas para posterior seqüenciamento automático no laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA/USP.

Uma futura comparação da região seqüenciada entre as cepas selvagens e mutantes, refutará qualquer tipo de contaminação.

Resultados

Seleção iniciando com fluconazol

Apenas quatro amostras (08-Unif/06, 09-Unif/06, 16-Unif/06 e 26-Unif/06) não apresentaram crescimento após 24h na fase de triagem. Estas então, foram utilizadas para o teste de seleção de mutantes resistentes ao fluconazol. Apenas três das quatro amostras submetidas ao

teste de seleção foram capazes de crescer em meio agar batata contendo 8,0µg/mL de fluconazol e meio RPMI contendo 1,0µg/mL de anfotericina B. Por isso, foram consideradas fenótipo de resistência e denominadas 9-SFA, 16-SFA e 26-SFA.

Seleção iniciando com anfotericina B

Após 24h nenhuma das 30 amostras analisadas apresentaram crescimento na fase de triagem. Porém, sete amostras (02-Unif/06, 03-Unif/06, 05-Unif/06, 19-Unif/06, 22-Unif/06, 23-Unif/06 e 28-Unif/06), utilizadas para o teste de seleção não apresentaram nenhum tipo de crescimento após 48h, diferindo das outras 23 amostras que apresentaram pelo menos uma colônia na placa. Apenas três amostras (03-SAF, 19-SAF e 22-SAF) apresentaram crescimento ao final do teste de seleção sendo consideradas fenótipo de resistência.

Perfil de sensibilidade das amostras mutantes

Os resultados das CIMs foram comparados aos resultados obtidos com as mesmas cepas antes do teste de crescimento na presença de fluconazol e anfotericina B.

Tabela 1 – Resultado das CIMs pelo método Etest.

Cepas	CIM inicial/CIM final (µg/mL) ¹	
	Fluconazol	Anfotericina B
09-SFA ²	0,75/48,0	0,190/0,230
16-SFA ²	0,38/0,75	0,064/0,640
26-SFA ²	0,50/1,00	0,190/0,016
03-SAF ³	0,38/0,50	0,023/0,023
19-SAF ³	0,50/0,75	0,094/0,047
22-SAF ³	0,75/1,00	0,047/0,230

¹CIM antes da seleção/CIM depois da seleção

²SFA- Amostra selecionada a partir de meio adicionado primeiro com fluconazol em seguida em meio adicionado de anfotericina B.

³SAF- Amostras selecionadas a partir de meio adicionado primeiro com anfotericina B e em seguida em meio adicionado com fluconazol.

A amostra 09-SAF que foi selecionada a partir da cultura de 09-Unif/06 (sensível a anfotericina B e fluconazol) em meio contendo fluconazol e em seguida em meio com anfotericina B, apresentou-se como resistente a fluconazol em relação à metodologia empregada. Mas, frente à anfotericina B, o perfil de sensibilidade se manteve o mesmo.

As amostras 16-SAF, 26-SAF, 03-SFA, 19-SFA e 22-SFA apresentaram pequeno aumento nos valores da CIM para fluconazol, mantendo-se classificadas como sensíveis.

Apenas a amostra 22-SAF apresentou aumento nos valores da CIM para anfotericina B, porém este aumento não levou a mudança de sensibilidade ao antifúngico, permanecendo sensível à droga.

PCR e Clonagem

A região ITS2 do rDNA das seis amostras que apresentaram fenótipo de resistência (09-SFA, 16-SFA, 26-SFA, 03-SAF, 19-SAF e 22-SAF) juntamente com suas respectivas cepas selvagens, foi amplificada por PCR e clonada. Uma nova reação de PCR foi realizada para confirmar a presença do inserto (região ITS2) ligado ao plasmídeo para confirmar a eficiência da clonagem. A maior parte das amostras apresentou tamanho de bandas esperado, sendo visualizadas em gel de agarose após PCR de inserto. Apenas a amostra 16-SFA não apresentou banda, necessitando a repetição da reação de clonagem.

O seqüenciamento e a análise da região ITS2 será posteriormente efetuados.

Discussão

amostra 09-SFA foi a única com resultado de CIM elevada após os testes de seleção. É possível que ela já existisse entre as colônias iniciais sensíveis, provavelmente, tenha ocorrido seleção de uma sub-população que apresentava algum tipo de mutação, a qual levou a resistência a fluconazol. Existem diferentes mecanismos bioquímicos que contribuem para o fenótipo de resistência à drogas em leveduras que poderiam explicar esse resultado. Dentre eles a alteração na composição dos esteróis e mudança nos alvos celulares dos antifúngicos que foram verificados em fenótipos de resistência que permaneceram estáveis após repiques sucessivos em meios livres da droga (MARICHAL et al., 1999 e SANGLARD, 2002).

Os mecanismos envolvidos na resistência ao fluconazol na amostra 09-SFA deverão ser elucidados futuramente por análises moleculares e comparados, pois, esta amostra foi obtida a partir de um mesmo isolado selvagem sensível a droga.

Conclusão

- Nenhuma amostra heteroresistente à anfotericina B foi obtida pela metodologia de seleção empregada neste estudo;
- O isolado 09-Unif/06 originou uma cepa heteroresistente ao fluconazol (09-SFA);
- Cepas heteroresistentes ao fluconazol podem ser obtidas com exposição prévia a este antifúngico.

Agradecimentos

Agradecemos à Unifal-MG e ao Pibic/CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

Referências

1. XU, J. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, 45(2), 420.
2. SAMBROCK J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2001**. 999p. Vol 1 e vol 2.
3. MARICHAL P, et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 41, 2229.
4. SLANGARD D. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* **2002**, 20(9), 462.