

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA ANFOTERICINA B EM CEPAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE PACIENTES HIV-POSITIVOS

**Marta Majewski, Rosilene Batista de Aguiar, Jonatas Rafael de Oliveira,
Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Universidade Estadual Paulista – UNESP / Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Laboratório de Microbiologia e Imunologia,
Avenida Eng. Francisco José Longo, 777 – São José dos Campos, marta_biologa@ig.com.br

Resumo – Leveduras do gênero *Candida* são comensais da cavidade bucal de pessoas saudáveis, mas podem causar infecções na presença de fator predisponente como a imunossupressão. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antifúngico do fluconazol e anfotericina B em *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos. Para tanto, em microplacas de 96 poços foi determinada a Concentração Inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos para 10 cepas clínicas da levedura. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37°C e posteriormente realizada a leitura das mesmas. Os resultados demonstram que todas as cepas foram sensíveis ao fluconazol e à anfotericina B. Concluiu-se que os antifúngicos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana nas cepas avaliadas.

Palavras-chave: *Candida albicans*, fluconazol, anfotericina B, HIV-positivo

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em pacientes portadores do vírus HIV, indivíduos transplantados ou que fazem uso de medicação imunossupressora. A cavidade bucal representa um dos sítios preferenciais para o desenvolvimento de infecção por *Candida* spp., sendo a candidose orofaríngea a infecção mais comum em imunodeprimidos (SAMARANAYAKE et al., 2001; SERRANO-GRANGER et al., 2005).

Os antifúngicos utilizados no tratamento de candidoses superficiais ou invasivas são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células fúngicas. Os derivados azólicos, particularmente o fluconazol, são efetivos no tratamento de candidoses (PEREA et al., 2002). Os poliênicos como a anfotericina B são utilizados em casos graves de infecções sistêmicas, embora apresente diversas desvantagens como nefrotoxicidade e insolubilidade em água. A suscetibilidade aos antifúngicos pode ser distinta em leveduras isoladas de um mesmo indivíduo, revelando resistência em diversos antifúngicos azólicos (NADAGIR et al., 2008).

De acordo com Teichert et al. (2002), aproximadamente 81% dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) são colonizados por cepas de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos. *C. albicans* é a mais isolada nas lesões de candidose bucal. Hamza et al. (2008) coletaram amostras de 292 pacientes infectados pelo vírus HIV com candidose

orofaríngea primária e recorrente. *C. albicans* foi a espécie mais isolada (84,5%). Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antifúngico do fluconazol e anfotericina B em leveduras isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, conforme protocolo 028/2010.

Foram utilizadas 10 cepas clínicas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos. As amostras foram armazenadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

Avaliou-se as concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 e 0,03 µg/mL dos antifúngicos anfotericina B (Sigma Companhia Química, St Louis, USA) e fluconazol (Galena Química e Farmacêutica), com o tempo de leitura de 24 h.

A suscetibilidade *in vitro* das amostras de *C. albicans* aos antifúngicos foi verificada de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards / Clinical Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI, 2002). Para obtenção dos inóculos, inicialmente as amostras de *C. albicans* foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e

incubadas durante 24 h a 37°C. Após, foram obtidas suspensões padronizadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) na concentração inicial de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente, esta suspensão foi diluída (1:2000) em meio RPMI 1640 tamponado (Sigma Companhia Química, St Louis, USA) a pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), para se obter uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL de leveduras.

O antifúngico anfotericina B foi preparado na concentração de 320 µg/mL, em dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma Companhia Química, St Louis, USA), e o fluconazol na concentração de 1250 µg/mL em água destilada esterilizada. Posteriormente, estas soluções foram diluídas em meio RPMI para a obtenção das concentrações entre 64 a 0,03 µg/mL.

Para o teste de microdiluição foram utilizadas placas de acrílico de 96 poços com fundo chato e tampa (Difco, USA). Em cada poço foram dispensados 100 µL da concentração do antifúngico e 100 µL do inóculo padronizado. As placas foram incubadas a 37°C e as leituras foram realizadas após 24 h. As placas com anfotericina B foram cobertas com papel alumínio para proteção da luz.

A leitura dos resultados foi realizada por dois examinadores e baseada em escala de turbidez visual pela comparação com a turvação do tubo controle, sendo: 0 (totalmente claro); 1 (levemente turvo); 2 (turbidez intermediária) referente a 80% da redução de crescimento; 3 (turbidez proeminente); e 4 (totalmente turvo).

A CIM do fluconazol foi determinada onde ocorreram aproximadamente 80% de redução do crescimento e para a anfotericina B onde se constatou completa ausência de crescimento (100%).

Resultados

As CIM dos antifúngicos para as cepas clínicas de *C. albicans* foram de 32, 4, 2, 1 e 0,25 µg/mL para o fluconazol e 8, 4, 2 e 0,5 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 1).

Discussão

Diversos estudos demonstraram que o patógeno mais frequentemente isolado de lesões bucais é *C. albicans*, correspondendo a 45% dos achados em pacientes nosocomiais, pacientes em tratamento quimioterápico, em indivíduos imunodeprimidos ou naqueles que fazem uso de corticóides (AQUINO et al., 2005).

Tabela 1 - CIM (µg/mL) dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B para cepas clínicas de *C. albicans*

Código da cepa clílica (<i>C. albicans</i>)	Antifúngico	
	Fluconazol	Anfotericina B
9	4	2
14	2	2
17	2	2
52	2	0,5
1s	1	4
4s	32	8
10s	4	0,5
24s	2	2
31s	0,25	2
39s	0,25	2

Os freqüentes relatos de resistência de *C. albicans* tem sido relacionados à quimioprevenção e ao tratamento com antifúngicos utilizados de forma indiscriminada. A eficácia do fluconazol no tratamento da candidose orofaríngea é atribuída às suas características como baixa toxicidade e amplo espectro de ação, sendo o fármaco de escolha primária nos tratamentos. Enwuru et al. (2008) estudaram a prevalência de espécies de leveduras em pacientes HIV-positivos que apresentavam candidose orofaríngea e verificaram a suscetibilidade aos antimicrobianos, a espécie de maior prevalência foi *C. albicans*. Dos 74 isolados estudados pelos autores 58 foram sensíveis ao fluconazol (8 µg/mL) e sete foram resistentes (64 µg/mL). Resultado semelhante foi obtido no presente estudo, uma vez que, todas as cepas isoladas de pacientes HIV-positivos foram sensíveis ao fluconazol.

Brito et al. (2010) isolaram leveduras da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos e verificaram a suscetibilidade a vários antifúngicos, dentre eles ao fluconazol e à anfotericina B. Os autores relataram que houve suscetibilidade distinta entre as espécies, mas não houve resistência ao fluconazol. Dos 57 isolados, dois foram resistentes à anfotericina B, (CIM > 2 µg/mL).

Com isso, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os encontrados na literatura.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que as cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos foram sensíveis aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Referências

- AQUINO, V.R.; LUNARD, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern. **Brazil Bras J Infect Dis**. V.9, p.412-8, 2005.

- BRITO, G.N.B.; INOCÊNCIO, A.C.; QUERIDO, S.M.R.; JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO, C.Y. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individual. **Braz Oral Res**. V. 25, n.1, p.28-33, 2010.

- ENWURU, C.A.; OGUNLEDUN, A.; IDIKA, N.; ENWURU, N.V.; OGBONNA, F.; ANIEDOBE, M.; ADEIGA, A. Fluconazole resistance opportunistic oro-pharyngeal *Candida* non-*Candida* yeast like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigéria. **Afri Health Sci**. V. 8, n.3, p.142-8, 2008.

- HAMZA, O.J.M.; MATEE, M.I.; MOSH, M.J.; SIMON, F.M.; MIKX, F.H.M.; MUGUSI, F.; HELDERMAN, W.H.P. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. **BMC Microbiol**. V.8, p.135-4, 2008.

- NADAGIR, S.D.; CHUNCHANUR, S.K.; HALES, L.H.; YASMEEN, K.; CHANDRASEKHAR, M.R.; PATIL, B.S. Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-*albicans* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. V.39, n.3, p.492-5, 2008.

- PEREA, S.; RIBOT, J.L.L.; WICKES, B.L.; KIRKPATRICK, W.R.; DIB, O.P.; BACHMAN, S.P. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**. V.46, n.6, p.1695-703, 2002.

- SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; POW, E.H.N.; BEENA, V.T.; YEUNG, K.W.S. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. **J Clin Microbiol**. V.39, n.9, p.3296-302, 2001.

- SERRANO-GRANGER, C.; CERERO-LAPIEDRA, R.; CAMPO-TRAPERO, J.; DEL RIO-HIGHSMITH, J. *In vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface. **Int J Prosthodont**. V.18, n.5, p.392-8, 2005.

- TEICHERT, M. C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. V.93, n.2, p.155-60, 2002.