

Centro Universitário de Patos - UNIFIP
 Curso de Medicina
 v. 5, n. 2, abr/jun 2020, p. 70-77.
 ISSN: 2448-1394



Journal of Medicine
 and Health Promotion

INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ITRACONAZOL FRENTE A CEPAS DE *Candida*

INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ITRACONAZOLE AGAINST *Candida*
 STRAINS

Shellygton Lima Silva
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
shellygton.lima@gmail.com

Francisco Patricio de Andrade Júnior
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

Edeltrudes de Oliveira Lima
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
edelolima@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: O estudo teve como objetivo, avaliar o grau de sensibilidade de isolados clínicos de espécies do gênero *Candida* spp frente ao itraconazol.

Métodos: Para avaliar o grau de sensibilidade das cepas analisadas, utilizou-se o protocolo experimental de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Resultados: Os resultados evidenciaram que todos os 17 microrganismos estudados se apresentaram resistentes ao itraconazol com valores CIM de 512 a 1024 µg/mL

Conclusões: Assim, observa-se a necessidade de novos protótipos candidatos a novos fármacos com atividade antifúngica frente espécies de *Candida* spp.

Palavras-Chave: Antimicrobianos, Atividade antifúngica, *Candida*

ABSTRACT

Objective: Study aimed to assess the degree of sensitivity of clinical isolates of species of the genus *Candida* spp against itraconazole.

Methods: Assess the degree of sensitivity of the strains analyzed; the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) protocol was used.

Results: Results showed that all 17 microorganisms studied were resistant to itraconazole with MIC values of 512 to 1024 µg/mL

Conclusions: Thus, there is a need for new prototypes of candidates for new drugs with antifungal activity against species of *Candida* spp.

Keywords: Antimicrobials, Antifungal activity, *Candida*.

1. Introdução

Onicomicose é uma infecção superficial fúngica que acomete o leito ungueal e tecidos adjacentes ocasionada por fungos dermatófitos (*Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*) e fungos não dermatófitos (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp), incluindo, principalmente, leveduras (*Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*)^{1,2}.

Os fungos do gênero *Candida*, são morfológicamente caracterizados como fungos dimórficos, apresentando células de brotamento ovais individuais com paredes celulares dos lados paralelos e septos verdadeiros, enquanto que suas pseudohifas apresentam-se em forma elíptica, com presença de constrições nas junções celulares e de estruturas ramificadas. Por sua vez, na forma filamentosa observa-se células alongadas anexadas de ponta a ponta³.

Estes fungos apresentam a capacidade de invadir tecidos queratinizados por meio de inoculação em sítio anatômico ungueal, seguido de disseminação e invasão de camadas de queratina na região do hiponíquio, pela superfície da lâmina ungueal através de processos enzimáticos e/ou químicos, pela borda proximal ou por disseminação sistêmica vascular ou linfática⁴.

Essa afecção acomete indivíduos saudáveis e predominantemente idosos e imunocomprometidos⁵, sendo classificadas conforme extensão do comprometimento, localização e coloração, em: onicomicose subungueal distal e lateral, superficial subungueal proximal, endonyx e distrofia ungueal total^{6,7}.

Clinicamente, a onicomicose é normalmente assintomática apenas com espessamento da placa ungueal, onicólise, queratose subungueal, alterações de coloração, onicorrexe e onicodistrofia. Conforme comprometimento da lesão, podem progredir e ocasionar dor, parestesia e limitações físicas, ocupacionais e sociais^{8,9}.

O tratamento farmacológico está baseado no uso de medicamentos tópicos, a exemplo de amorfilina 5%, ciclopirox 8% e solução de tioconazol 28% proporcionando baixa taxa de remissão e/ou cura. No entanto, são feitos tratamentos sistêmicos, utilizando fluconazol e itraconazol para infecções moderadas (20-60%) e em casos de onicomicose grave (>60%)⁷.

Neste contexto, em virtude da baixa eficácia de tratamento disponíveis na prática clínica e em decorrência de modificações genotípicas, ocasionando mecanismos de resistência. O presente estudo teve como objetivo, elucidar o grau de sensibilidade de isolados clínicos de espécies do gênero *Candida* por meio do protocolo experimental de Concentração Inibitória Mínima.

2. Métodos

2.1 Local de trabalho

O modelo experimental foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2.2 Obtenção e preparo do itraconazol

Para a realização dos estudos *in vitro* o itraconazol foi adquirida da Sigma Aldrich[®], São Paulo, Brasil e comercialmente de farmácia de manipulação na cidade João Pessoa-Paraíba/Brasil. A preparação ocorreu a partir da solubilização dos fármacos com Tween 80[®] a 2% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, completando-se o volume final (q.s.p) para 5 mL, com água destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de 2048 µg/mL¹⁰.

2.3 Meios de cultura

Foram utilizados os meios Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato, adquiridos da Difco Laboratories Ltd (USA, France) e INLAB, São Paulo, Brasil. Ambos os meios foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, sendo solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121° C por 15 minutos.

2.4 Linhagens do gênero *Candida*

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados com isolados clínicos obtidos de material biológico de lâmina ungueal de pacientes com hipótese de diagnóstico atendidos no Laboratório de Patologia Clínica - HEMATO, localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Os micro-organismos utilizados na pesquisa: *Candida albicans*: LM-03, LM-26, LM-44, LM-74, LM-123, LM-157, LM-165, LM-175, LM-441, LM-600, LM-615, *Candida tropicalis*: LM-98, LM-111, LM-135 e *Candida parapsolosis*: LM-78, LM-197 e LM-707. Estes foram mantidos armazenados em meio ASD, sob refrigeração, a uma temperatura de 4°C. Além disso, é importante enfatizar que estas cepas foram devidamente registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número AA1970F.

2.5 Inóculo

Para a preparação do inóculo, foi realizada cultura das cepas e isolados clínicos em tubos estéreis contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 48 horas 35 ± 2 °C.

Após esse período de incubação uma alíquota do meio contendo o fungo foi coletada e, em seguida, suspensa em solução fisiológica estéril a 0,9%. A suspensão resultante foi agitada por meio de vórtex e, logo após, a densidade do inóculo foi padronizada conforme a escala padrão de McFarland 0,5 para a obtenção de 10^6 UFC/mL^{10,11,12}.

2.6 Concentração Inibitória Mínima

O potencial antifúngico do itraconazol foi avaliado por meio da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 cavidades com fundo em formato de "U", em triplicata.

Em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 µL de meio líquido RPMI - sem bicarbonato, duplamente concentrado e, 100 µL da solução de itraconazol duplamente concentrados apenas nos poços da primeira linha da microplaca. E por meio de uma diluição seriada à razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 a 2 µg/mL^{10,11,12}. Em seguida, foram adicionados 10 µL do inóculo das diferentes espécies fúngicas. Além do mais, foi realizado o controle de viabilidade dos micro-organismos (meio de cultura com as linhagens fúngicas) e de esterilidade (somente o meio de cultura) nas duas últimas linhas da microplaca. Por fim, as placas foram fechadas, seladas e incubadas na temperatura de 35 ± 2 °C no período de 24-48h^{11,12} decorrido esse período foi feita a leitura dos ensaios biológicos.

A CIM para o itraconazol (substância teste) foi considerada como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos poços, quando comparados aos grupos controles.

3. Resultados e Discussão

Os resultados para esse modelo experimental estão expressos na tabela 1, em que é possível observar a CIM do itraconazol para diferentes cepas e isolados clínicos do gênero *Candida*.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima do Itraconazol frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Cepas	Itraconazol (Sigma-Aldrich®)	Itraconazol (Manipulado)	Controle de viabilidade	Controle de esterilidade
	CIM µg/mL	CIM µg/mL		
<i>Candida albicans</i>				
LM-03	1024	1024	+	-
LM-23	512	1024	+	-
LM-44	512	1024	+	-
LM-74	1024	512	+	-
LM-123	512	1024	+	-
LM-157	1024	1024	+	-
LM-165	1024	1024	+	-
LM-175	1024	1024	+	-
LM-441	1024	512	+	-
LM-600	1024	1024	+	-
LM-615	512	1024	+	-
<i>Candida tropicalis</i>				
LM-98	1024	1024	+	-
LM-111	512	1024	+	-
LM-135	1024	1024	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>				
LM-78	1024	1024	+	-
LM-197	512	1024	+	-
LM-707	1024	1024	+	-

Os resultados estão expressos pela média aritmética de três determinações. (+) indica crescimento de micro-organismos; (-) indica ausência de crescimento de micro-organismos.

Espécies do gênero *Candida* são a causa mais comum de infecções fúngicas adquiridas, colonizando habitualmente a pele e/ou superfícies mucosas dos indivíduos. Devido ao uso prolongado e inadequado de antibióticos de amplo espectro e de glicocorticóides, a incidência de candidíase aumentou 5 vezes nos últimos 10 anos. Portanto, os antifúngicos azóis, como o itraconazol são eficazes para candidíase, todavia a resistência emergente é um grande desafio para estratégias terapêuticas¹³.

Diante de todos os resultados pode-se observar que todos os microorganismos apresentaram resistência as diferentes formas de obtenção comercial do itraconazol com valores de CIM de 512 a 1024 µg/mL visto que valores ideais de sensibilidade corresponderiam de 0,0313 a 16 µg/mL^{12,14}.

Os resultados obtidos corroboram com dados que buscaram avaliar a atividade antifúngica de itraconazol frente diferentes espécies do gênero *Candida* isolados de diferentes sítios anatômicos^{15,16}

O itraconazol pertencente a classe dos azóis que são fármacos de primeira escolha para o tratamento de candidíase, atuando através da inibição da enzima 14α-esterol-desmetilase. Entretanto, os fenômenos de resistência têm contribuído para altas taxas de

recidivas da doença, gastos econômicos individuais e aos sistemas de saúde, fazendo-se necessário o uso de associação de diferentes fármacos o que promove maior probabilidade de efeitos colaterais e/ou adversos¹⁷.

Assim, os altos valores de CIM encontrados, estão relacionados a mecanismos específicos contra esse fármaco, como modificações na expressão de genes ERG11, CDR1, CDR2 e MDR1, alteração ou superexpressão de alvos, regulação positiva de transportadores e ativação de resposta ao estresse do fármaco^{18,19}.

Nesse contexto, devido à importância de altos índices de morbidade e mortalidade, ocasionados por espécies do gênero *Candida* de importância clínica, aos diversos mecanismos de resistência aos medicamentos antifúngicos e progressão de taxa de reincidência de doença^{19,20} demonstram uma ineficiência desse fármaco, fazendo-se necessário a busca por agentes antifúngicos que sejam mais eficazes, seguros e menos tóxicos. Portanto os dados expressos da pesquisa fomentam grande resistência que os diferentes microrganismos apresentam diante do itraconazol.

4. Conclusões

As 17 cepas avaliadas, apresentaram-se resistentes ao fármaco itraconazol, em que foram observados valores de CIM entre 512 a 1024 µg/mL.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram necessidade de descoberta e/ou desenvolvimento de novos candidatos fármacos com atividade antifúngica frente espécies de *Candida*, assim como, serve de alerta para a intensificação de campanhas que busquem informar a população acerca do uso racional de antifúngicos.

Referências

1. Gupta AK, Versteeg SG, Shear. NH. A practical application of onychomycosis cure-combining patient, physician and regulatory body perspectives. J. Eur. Acad. Dermatol. 2019; 33 (2): 281-287.
2. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. J. Cutan. Med. Surg. 2017; 21 (6): 525-539.
3. KADOSH D, MUNDODI, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. J. Fungi. 2020; 6 (1): 1-8.
4. Trevisan F. Clipping ungueal na onicomicose e sua correlação com achados de cultura. [Dissertação]. Paraná: Universidade Federal do Paraná/UFP; 2016. 22 p.
5. Gupta AK, Stec N. Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. Expert Opin. Emerg. Drugs. 2019: 1-8.
6. Piraccini BM, Alessandrini A. Onychomycosis: A Review. J. Fungi. 2015; 1 (1): 30-43.

7. Gupta AK, Macleod MA, Tosti, A. Onychomycosis: Clinical Aspects. In: Scher and Daniel's Nails. Springer, Cham, 2018. p. 153-159.
8. Allevato MAJ. Diseases mimicking onychomycosis. Clin Dermatol. 2010; 28 (2): 164-177.
9. Schaller M, Sigurgeirsson B, Sarkany M. Patient-reported outcomes from two randomised studies comparing once-weekly application of amorolfine 5% nail lacquer to other methods of topical treatment in distal and lateral subungual onychomycosis. Mycoses. 2017; 60 (12): 800-807.
10. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. New York: Willians & Wilkins; 1991: 739-88.
11. Hadacek F, Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem analysis. 2000; 11 (3):137-147.
12. CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute. NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Tests for Determining Sensitivity to Yeast Antifungal Therapy; Approved Standard - Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 United States, 2002a.
13. Feng W, Yang J, Pan Y, Xi Z, Qiao Z, MA Y. The correlation of virulence, pathogenicity, and itraconazole resistance with SAP activity in *Candida albicans* strains. Can. J. Microbiol. 2016; 62: 1-6.
14. Jayachandran AL, Katragadda R, Ravinder T, Vajravelu L, Manorajan L, Hemalatha S, Shanmugam K. Antifungal Susceptibility Pattern among *Candida* species: An Evaluation of Disc Diffusion and Broth Micro-dilution Method. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2018; 8 (3): 97-101.
15. Filho AAO, Oliveira HMBF, Sousa JP, Meireles DRP, Maia GLA, Filho JMB, Siqueira Júnior JP, Lima EO. *In vitro* anti-*Candida* activity and mechanism of action of the flavonoid isolated from *Praxelis clematidea* against *Candida albicans* species. J. Appl. Pharm. 2016; 6 (1):66-69.
16. Lima IO, Pereira FO, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, Diniz MFFM. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. J. Essent. Oil Res. 2013; 25 (2): 138-142.
17. Dekkers BGJ, Veringa A, Marriott DJE, Boonstra JM, Van der Elst KCM, Doukas FF, Mclachlan AJ, Alffenaar JWC. Invasive Candidiasis in the Elderly: Considerations for drug therapy. 2019; 11 (22): 2955-2974.
18. Teol JQM, Leel SJY, Tan AL, Lim RSML, Cail Y, Lim TP, Kwa ALH. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. BMC Infectious Diseases. 2019; 19 (1): 1-4.

19. Reviel NM, Iyerl KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 45: 70-76.
20. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *Int J Infect Dis.* 2017; 216 (3): 445-451.