



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

ELSON BRAGA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Candida parapsilosis* À
CASPOFUNGINA UTILIZANDO SOLUÇÃO DE ALBUMINA 50%.

FORTALEZA

2012

ELSON BRAGA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Candida parapsilosis* À
CASPOFUNGINA UTILIZANDO SOLUÇÃO DE ALBUMINA 50%.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Coordenação do Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito à
obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Everardo Albuquerque
Menezes

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

F44a Ferreira, Elson Braga
 Avaliação da sensibilidade de *Candida parapsilosis* à caspofungina utilizando solução de albumina 50% / Elson Braga Ferreira. - 2012.
 41 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes

.

1. *Candida parapsilosis* 2. Caspofungina 3. Albumina Bovina I. Título.

CDD 615.1

ELSON BRAGA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Candida parapsilosis* À
CASPOFUNGINA UTILIZANDO SOLUÇÃO DE ALBUMINA 50%.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Coordenação do Curso de Farmácia, da
Universidade Federal do Ceará (UFC), como
requisito parcial para a obtenção do título de
Farmacêutico.

Monografia aprovada em: ____/____/____.

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes

Orientador

Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho

Membro

Prof. Ms. Francisco Afrânio Cunha

Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente da vida e intervenção em minha caminhada.

Ao meu orientador e amigo, Professor Everardo Albuquerque Menezes, pelas lições acadêmicas e ensinamentos pessoais.

Ao meu amigo Francisco Afrânio Cunha, que se mostrou disponível em todos os processos do TCC e que não mediu esforços para contribuir da melhor forma possível.

Aos professores do curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, que trouxeram muitos aprendizados necessários para o crescimento pessoal e acadêmico. Não irei citar todos, mas cada um trouxe algo muito valioso, tornando memoráveis os momentos vividos e para sempre saudosos.

Aos técnicos de laboratório, funcionários da Universidade Federal do Ceará, que foram muito prestativos e proporcionaram um excelente convívio.

À pessoa fundamental na minha criação e que sempre ofereceu o melhor possível para que eu pudesse ter uma vida confortável, que sempre exerceu bem o papel de Mãe, Patricia Braga Ferreira.

Aos amigos conquistados durante o curso de Farmácia, que proporcionaram momentos de diversão e que tornaram o curso ainda mais agradável.

Aos amigos que compartilharam o gosto de torcer pelo Fortaleza Esporte Clube, participando dos momentos mais felizes da minha vida.

RESUMO

O tratamento de infecções fúngicas é limitado, pois são poucas as opções de antifúngicos disponíveis no mercado. Além disso, a resistência fúngica limita ainda mais o uso de determinados antifúngicos. As equinocandinas são os mais recentes fármacos utilizados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. A caspofungina é o fármaco protótipo desse grupo, que apresenta mecanismo de ação semelhante às outras equinocandinas. É ativa contra cepas de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. A albumina é a mais abundante, multifuncional, carregada negativamente, proteína do plasma, que apresenta propriedades antioxidantes, transportadoras e funções enzimáticas. Essa proteína serve como transportador endógeno de fármacos e exerce efeito nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) da caspofungina. Este trabalho buscou avaliar a influência da albumina bovina 50 mg/mL sobre os valores de CIMs para *Candida parapsilosis*. O efeito da albumina foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo RPMI. Foram testadas 22 cepas de *C. parapsilosis*. Quando a caspofungina foi avaliada sozinha foi observado que todas as *C. parapsilosis* apresentaram sensibilidade. A solução de albumina bovina 50 mg/mL elevou as CIMs da caspofungina. O efeito permaneceu após 24 h e 48 h de incubação. As CIMs da caspofungina obtidas com albumina foram estatisticamente diferentes das CIMs sem albumina, a elevação das CIMs foi da ordem de 128 vezes. Os efeitos clínicos dessa elevação ainda não são conhecidos e essa interação não é completamente compreendida e estudos com um maior número de cepas são necessários para elucidar e entender as implicações desse fenômeno.

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*. Caspofungina. Albumina Bovina.

ABSTRACT

The treatment of fungal infections is limited, because unlike antibiotics, there are several options, the available antifungal agents are few. Moreover, the fungal resistance further limits the use of some antifungals. The echinocandins are the most recent drugs used to treat systemic fungal infections. Caspofungin is the prototype drug of this group, which has a similar mechanism to the other echinocandins. It is active against strains of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. Albumin is the most abundant, multifunctional, negatively charged, plasma protein, which has antioxidant properties, carriers and enzymatic functions. This protein serves as an endogenous drug carrier and exerts an effect on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of caspofungin. This study evaluated the influence of bovine serum albumin 50 mg/ml on the values of MICs for *Candida parapsilosis*. The effect of albumin was measured by broth microdilution method in RPMI. 22 strains of *C. parapsilosis* were tested. When caspofungin was evaluated alone was observed that all *C. parapsilosis* showed sensitivity. A bovine albumin solution 50 mg/ml increased the MICs of caspofungin. The effect remained significant after 24 h and 48 h incubation. The MICs of caspofungin obtained with albumin were statistically different MICs without albumin. The elevation of the MIC was about 128 times. The clinical effects of this increase are not yet known and this interaction is not completely understood and studies with larger numbers of strains are needed to elucidate and understand the implications of this phenomenon.

Keywords: *Candida parapsilosis*. Caspofungin. Albumin Bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais Equinocandinas utilizadas no Tratamento de Infecções Fúngicas .	13
Figura 2	Estrutura da parede celular de <i>Candida</i> spp.	14
Figura 3	Parâmetros farmacodinâmicos de drogas. C _{max} - concentração máxima. AUC- área sob a curva. MIC- concentração inibitória mínima.	16
Figura 4	Cepas de <i>Candida parapsilosis</i> em meio ágar batata dextrose	26
Figura 5	<i>Candida parapsilosis</i> em meio cromógeno.	27
Figura 6	Caldos RPMI utilizados no teste de microdiluição, o frasco da direita contém RPMI e albumina, conferindo uma coloração amarelada.	28
Figura7	Teste de sensibilidade da caspofungina pela técnica de Microdiluição em caldo.	28
Figura 8	Inoculação de placas no teste de Mirodiluição em caldo	29
Figura 9	Perfil de Sensibilidade a caspofungina de 22 Cepas de <i>C. parapsilosis</i> testadas em RPMI com e sem albumina. Cada casulo representa o número de cepas.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais representantes das equinocandinas	12
Tabela 2	Características Farmacocinéticas das equinocandinas	15
Tabela 3	Atividade de Equinocandinas contra <i>Candida</i> spp. isoladas em um estudo global	18
Tabela 4	Pontos de corte para espécies de <i>Candida</i> spp. frente a equinocandinas	19
Tabela 5	Atividade de Equinocandinas contra <i>Candida</i> spp. isoladas na América Latina.	19
Tabela 6	CIMs _{50%} da caspofungina de 22 cepas de <i>C. parapsilosis</i> testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 24 h.	29
Tabela 7	CIMs _{90%} da caspofungina de 22 cepas de <i>C. parapsilosis</i> testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 24h.	30
Tabela 8	CIMs _{50%} da caspofungina de 22 cepas de <i>C. parapsilosis</i> testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 48 h.	30
Tabela 9	CIMs _{90%} da caspofungina de 22 cepas de <i>C. parapsilosis</i> testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 48 h.	31
Tabela 10	Relação entre a CIM _{50%} (albumina)/CIM _{50%} (sem albumina) obtidas para caspofungina contra as cepas de <i>C. parapsilosi</i> em 24hs.	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Organismos fúngicos e infecções fúngicas.....	11
1.2 Novas drogas antifúngicas: Equinocandinas.....	12
1.3 Aspectos farmacocinéticos das equinocandinas.....	14
1.4 Características farmacodinâmicas de drogas antifúngicas.....	15
1.5 Albumina e Equinocandinas, uma estranha relação.....	16
1.6 Concentração Inibitória Mínima das equinocandinas para <i>Candida spp.</i>	18
1.7 Caspofungina.....	20
1.8 <i>Candida parapsilosis</i>	21
2OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Micro-organismos.....	23
3.2 Isolamento e purificação das cepas.....	23
3.3 Identificação presuntiva e confirmação da identificação.....	23
3.4 Preparação da solução de albumina 50mg/mL.....	23
3.5 Agentes antifúngicos.....	24
3.6 Teste de sensibilidade pelo Método de Microdiluição em caldo RPMI.....	24
3.7 Interpretação dos resultados.....	24
3.8 Análise estatística.....	25
3.9 Descarte de amostras.....	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Organismos fúngicos e infecções fúngicas.

O reino Fungi é composto por uma enorme e diversificada variedade de micro-organismos, estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies, no entanto somente 5% são conhecidos. Fungos podem causar doenças em plantas, animais, seres humanos e até em outros fungos. Algumas espécies podem causar doenças sérias em humanos que se não diagnosticadas e tratadas podem levar à morte. As mais comuns são: candidoses, aspergiloses, criptococoses, histoplasmose, micetomas, mucormicoses, coccidiomicose e paracoccidioidomicose. Outro grupo de fungos chamados de dermatófitos atacam pele, olhos, cabelo, unhas, pés e mãos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Identificar esses organismos e estabelecer um tratamento adequado é um desafio para os profissionais de saúde.

O fungo mais isolado de Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) continua sendo *Candida* spp., que faz parte da microbiota humana e pode ocasionar uma série de doenças clínicas que dependem do local de desenvolvimento do fungo e do tipo de paciente envolvido. A mortalidade associada à infecções causadas por *Candida* spp. situa-se entre 30-40% (ARENDRUP 2010).

Dentro do gênero *Candida*, a levedura mais importante é a *Candida albicans*. É um patógeno oportunista que pode causar infecções disseminadas em grupos de pacientes específicos, incluindo, pacientes com HIV, os que utilizam corticocosteróides, transplantados e pacientes com câncer. Essa levedura faz parte da nossa microbiota e em algum momento ela adquire a capacidade de causar doenças. Essa transição ainda não é bem compreendida, mas estudos apontam que a capacidade desse micro-organismo em produzir fatores de virulência aliada ao sistema imune do hospedeiro não plenamente funcionante, podem ser os fatores, que auxiliem na instalação da condição patológica (HORN *et al.*, 2009).

Nos últimos vinte anos têm ocorrido uma elevação das IFIs na América Latina. Aquelas causadas por leveduras são mais prevalentes na América Latina do que na Europa e Estados Unidos, apresentando também uma distribuição de espécies diferentes da encontrada em outros locais. As leveduras mais comumente isoladas na América Latina são *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. No Estados Unidos e Europa a *C.*

glabrata é uma levedura endêmica o que não ocorre no Brasil (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012). No Ceará, um estudo recente evidenciou que as espécies mais prevalentes são as mesmas isoladas no resto da América Latina *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (MENEZES *et al.*, 2011).

O tratamento de infecções fúngicas é limitado, pois diferentemente dos antibióticos, que existem diversas opções, os antifúngicos disponíveis são poucos. Além disso, a resistência fúngica limita ainda mais o uso de determinados antifúngicos (PFALLER, 2012). O cenário não é nada promissor, pois o surgimento de drogas antifúngicas não é tão rápido quanto seria necessário, então o tratamento de IFIs ainda é um desafio para todos os profissionais de saúde (KONTOYIANNIS 2012).

1.2 Novas Drogas Antifúngicas: Equinocandinas.

Na última década, três compostos com espectro similar, farmacocinética, segurança e eficácia antifúngica foram desenvolvidos, conhecidos como equinocandinas, são eles: anidulafungina, caspofungina e micafungina (Tabela 1 e Figura 1) (DENNING e HOPE, 2010; GROLL e TRAGIANNIDIS, 2010).

Tabela 1: Principais representantes das equinocandinas.

Droga	Primeira patente	Licença FDA	Laboratório	Custo diário para paciente 70 kg (EUA) US\$
Anidulafungina	1993	2006	Pfizer®	215
Caspofungina	1994	2001	Merck-Sharp-Dohme®	290-405
Micafungina	1996	2005	Astellas-Pharma®	225

Fonte: RIZOS *et al.*, 2011, com modificações.

As equinocandinas são a mais nova classe de medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Quimicamente elas são lipopeptídeos anfifílicos semi-sintéticos de uso intravenoso, agem diretamente na parede celular dos fungos, através da inibição não competitiva da

enzima 1,3- β -D-glucano sintetase. Esta enzima possui duas subunidades, Rho1p e FKSp, na qual as equinocandinas ligam-se e inibem a produção de 1,3- β -D-glucano, componente principal da parede celular do gênero *Candida*. Com isso, ao continuar o seu processo de remodelação da parede celular e expansão, as células acabam por serem lisadas, devido à falta de rigidez proveniente da ausência de 1,3- β -D-glucano em sua estrutura (Figura 2) (DENNING 2003; DINUBILE, *et al.*, 2004).

Figura 1- Principais Equinocandinas utilizadas no Tratamento de Infecções Fúngicas.

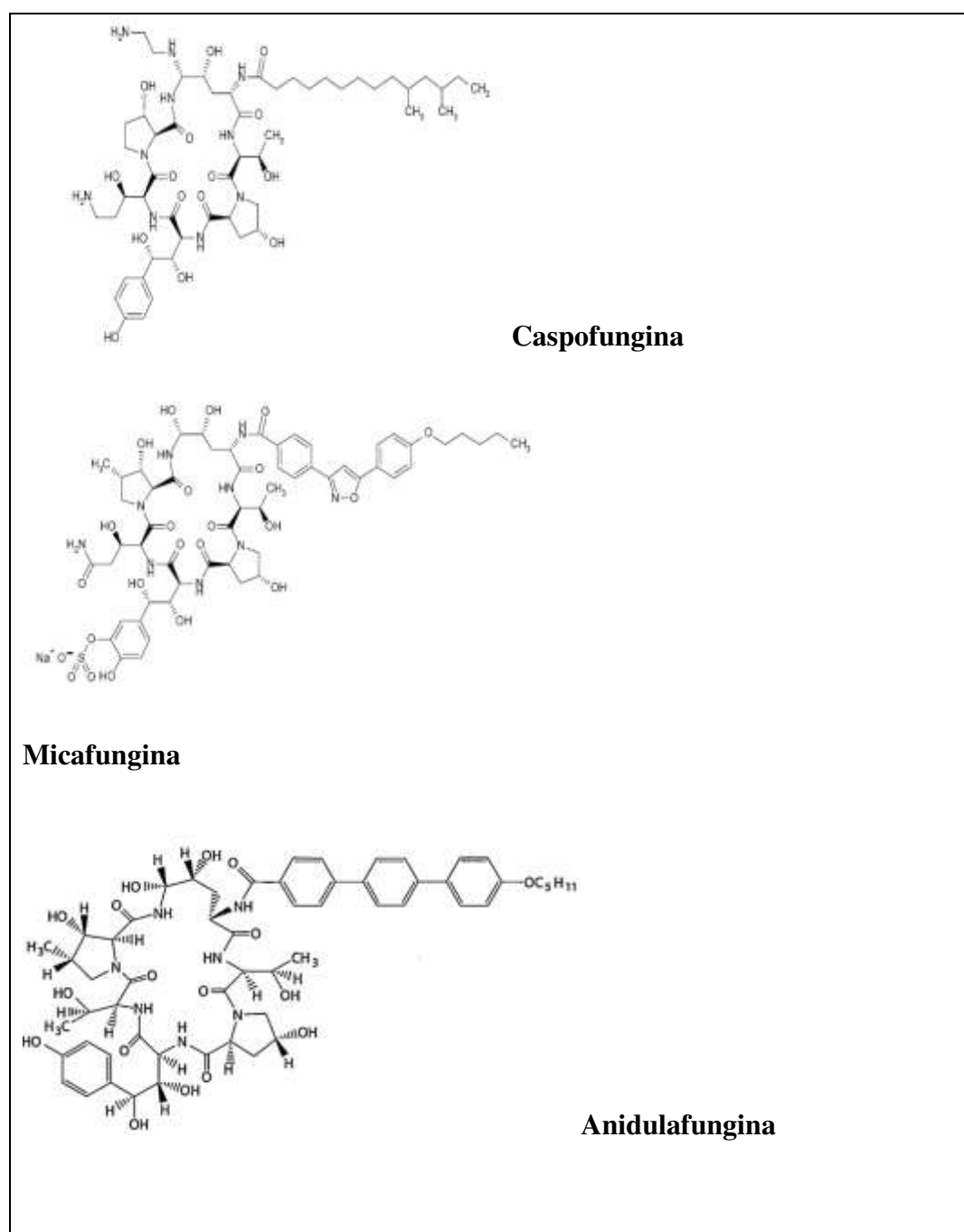
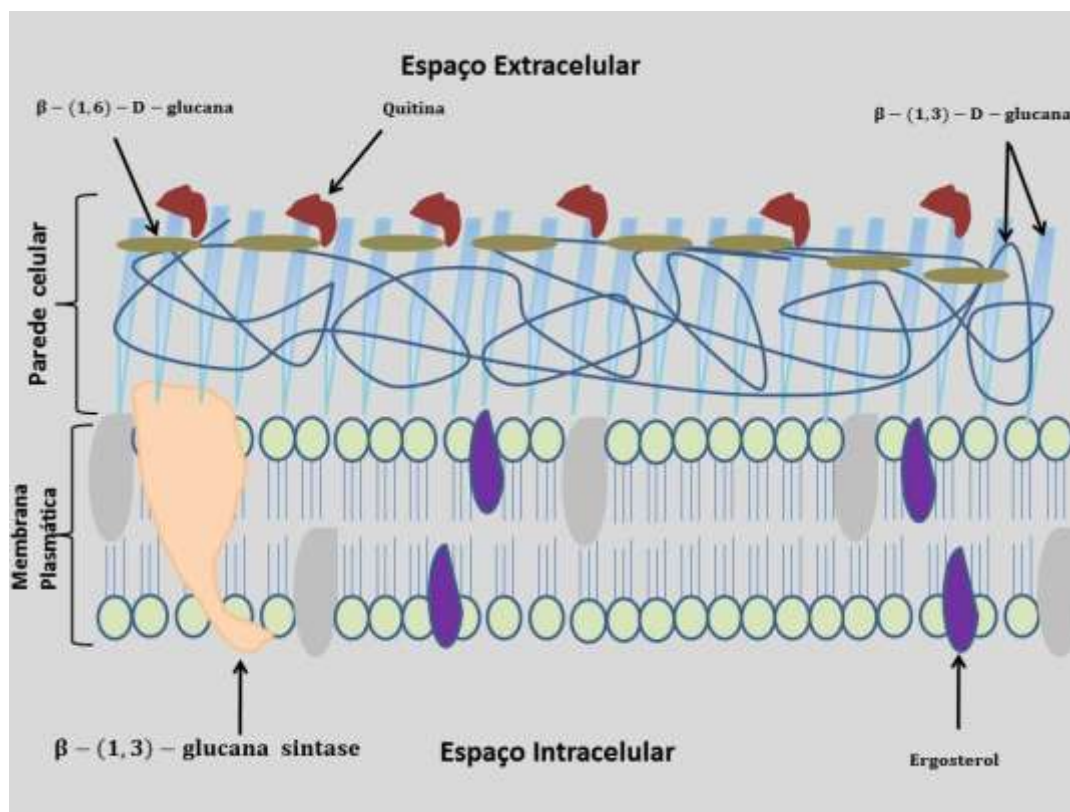


Figura 2- Estrutura da parede celular de *Candida* spp.



Fonte: KARTSONIS *et al.*, 2003, com modificações.

As equinocandinas são uma arma no combate as IFIs, no entanto o entendimento de todas as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dessa nova classe ainda é incompleto (ANDES 2006; MIGOYA *et al.*, 2011).

1.3 Aspectos farmacocinéticos das equinocandinas.

Investigações farmacocinético-farmacodinâmicas têm sido úteis para definir a dosagem de agentes antifúngicos e para estabelecer os pontos de corte dos testes de sensibilidade *in vitro* no Laboratório de Microbiologia (ANDES 2003).

Estudos farmacocinéticos descrevem como o corpo manuseia a droga, incluindo absorção, distribuição, ligação à proteínas plasmáticas, metabolismo e eliminação. A comparação de antifúngicos geralmente é baseada nas suas propriedades farmacocinéticas (ANDES 2006). Na Tabela 2 são mostradas algumas propriedades farmacocinéticas das equinocandinas disponíveis no mercado mundial.

Tabela 2: Características Farmacocinéticas das equinocandinas

Parâmetro	Anidulafungina	Caspofungina	Micafungina
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	7,2	9,9	10,1
$T_{1/2}$ plasmática (h)	26,5	9-11	15-17
AUC (mg/h.L)	110,3 (1x 200 mg, seguida de 100 mg/dia)	97,6 (1x 70 mg, seguida de 50 mg/dia)	115 (100 mg/dia)
Ligação proteínas plasmáticas (%)	>99	97	99,75
Volume de Distribuição (L/kg)	0,6	0,15	0,39
Metabolismo	<i>Não hepático:</i> degradação espontânea-peptidases	<i>Hepático:</i> hidrólise N-acetilação espontânea e degradação.	<i>Hepático:</i> aril-sulfatase, metiltransferase CYP3A.
Eliminação	Fezes	Fezes	Fezes

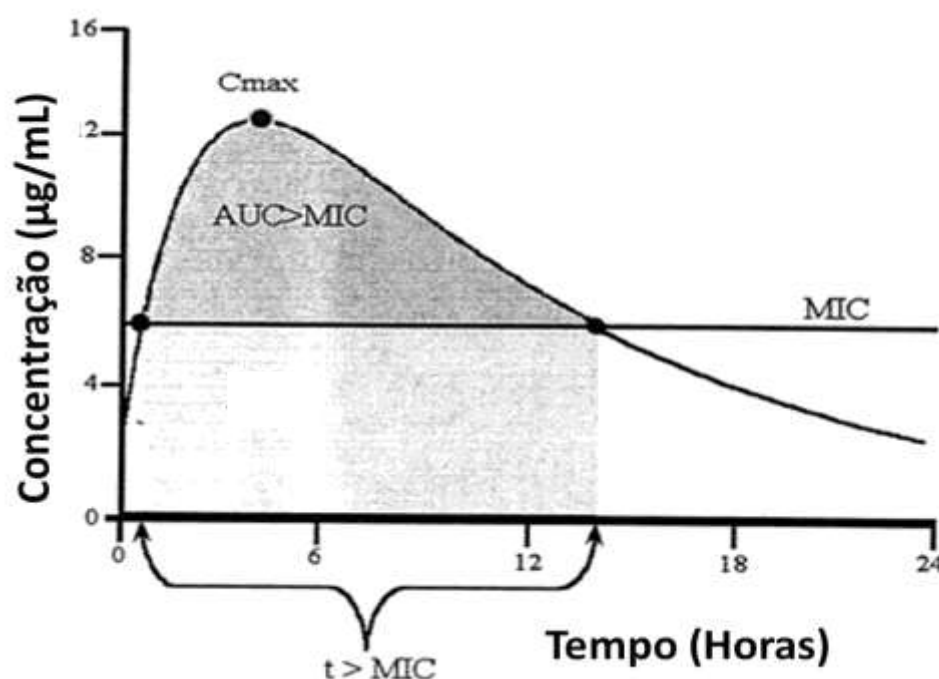
Fonte: GLÖCKNER *et al.*, 2009.

1.4 Características farmacodinâmicas de drogas antifúngicas.

Um dos principais objetivos da terapia antimicrobiana é a caracterização da relação entre dose, regime posológico, concentração da droga no corpo, susceptibilidade *in vitro* do micro-organismo e efeitos da droga. A farmacodinâmica avalia essas relações entre farmacocinética e o resultado da ação de drogas. Três parâmetros farmacodinâmicos são extremamente relevantes e têm sido usados para descrever essas relações. Esses parâmetros são: pico de concentração em relação à CIM ($C_{\max}/\text{CIM}$), a área abaixo da curva de concentração em relação ao CIM, no período de 24 h (AUC/CIM) e o tempo que a concentração da droga excede a CIM ($T > \text{CIM}$), como

descrito na Figura 3. Esses parâmetros determinam a frequência na qual a droga é mais eficaz (ANDES 2003).

Figura 3: Parâmetros farmacodinâmicos de drogas. C_{max}- concentração máxima. AUC- área sob a curva. MIC- concentração inibitória mínima.



Fonte: MUELLER, *et al.*, 2004.

As equinocandinas são administradas uma única vez ao dia como descrito na Tabela 2, essas drogas apresentam um fenômeno chamado de efeito pós-antifúngico (PAFE), que é a inibição do fungo mesmo após a retirada da droga. Esse efeito possibilita a utilização da droga somente uma única vez a cada 24 h (SHIELDS *et al.*, 2011).

1.5 Albumina e Equinocandinas, uma estranha relação.

A albumina humana é sintetizada no fígado e está presente no sangue em uma concentração de $7,0 \times 10^{-4}$ M (50 mg/mL ou 3,8-4,8g/100 mL). A albumina é a mais abundante, multifuncional, carregada negativamente, proteína do plasma, que apresenta

propriedades antioxidantes, transportadoras e funções enzimáticas. Ela apresenta três domínios e cada domínio possui 10 hélices. Essa proteína serve como transportador endógeno de ácidos graxos, hemina, bilirrubina e triptofano. Por muito tempo a albumina vem despertando a atenção da indústria farmacêutica, exatamente pela sua propriedade de interação com fármacos e alteração de seus parâmetros farmacocinéticos. Muitas das interações albumina e fármacos ainda necessitam de explicação (VARSHNEY *et al.*, 2010; ZEITLINGER *et al.*, 2011).

A ligação a proteínas plasmáticas por parte de drogas antimicrobianas desempenha um papel chave no entendimento dos parâmetros farmacodinâmicos/farmacocinéticos das equinocandinas. Essa classe de drogas se liga a proteínas séricas, alterando suas propriedades antifúngicas. A taxa de ligação de equinocandinas a proteínas séricas ultrapassa 98% (Tabela 2) e como descrito em alguns estudos essa ligação/interação parecem alterar a atividade antifúngica destes compostos. É bem conhecido que somente a parte livre da droga pode entrar na célula e desenvolver sua ação (BEER *et al.*, 2009).

A adição de soro humano contendo 50% de albumina no ensaio CIM (Concentração Inibitória Mínima) ou a adição de albumina 50 mg/mL elevou a CIM para equinocandinas frente a cepas de *Candida* spp. As razões para essa elevação permanecem obscuras e não podem ser explicadas apenas pela elevada taxa de ligação droga-albumina (GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011).

A importância *in vivo* desses achados observados *in vitro* para atividade antifúngica das equinocandinas ainda não é completamente entendido, nem o significado clínico que eles podem ter. No entanto o efeito da ligação com albumina e sua consequente elevação do MIC pode explicar a diferença de dosagem desses compostos na prática clínica (ODABASI *et al.*, 2007).

Um estudo comprovou que a adição de soro humano elevou a CIM de equinocandinas em cepas de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* e as razões continuam sem explicação convincente e o seu significado clínico ainda permanece incerto. *C. parapsilosis* costuma apresentar uma CIM mais elevado para as equinocandinas e novos estudos devem ser realizados para tentar elucidar e quem sabe explicar esse fenômeno (SARIBAS *et al.*, 2011).

1.6 Concentração Inibitória Mínima das equinocandinas para *Candida* spp.

O teste de sensibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em RPMI caldo é uma técnica recente e passa constantemente por reformulações (CLSI 2008a, CLSI 2008b). Recentemente foram definidos novos pontos de corte para equinocandinas que ajudam a decidir se cepas de *Candida* spp. são sensíveis ou resistentes as equinocandinas em testes *in vitro* (PFALLER *et al.*, 2011). Na Tabela 3 são mostrados os novos pontos de corte. Como pode ser visto na Tabela 3, *C. parapsilosis* apresentam pontos de corte mais elevados para a echinocandinas, diferentes de outras cepas.

Tabela 3: Pontos de corte para espécies de *Candida* spp. frente a equinocandinas.

Agente Antifúngico	Leveduras	MIC (µg/mL)			Halo (mm)		
		S	I	R	S	I	R
Anidulafungina	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1,0			
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1,0			
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1,0			
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4,0	≥8,0			
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥17	15-16	≤14
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥17	15-16	≤14
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥17	15-16	≤14
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4,0	≥8,0	≥13	11-12	≤10
Micafungina	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥22	20-21	≤19
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥22	20-21	≤19
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1,0	≥22	20-21	≤19
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4,0	≥8,0	≥16	14-15	≤13

R-resistente. I- intermediário. S- sensível. Fonte: PFALLER *et al.*, 2011, com modificações.

Em um estudo realizado avaliando a sensibilidade de cepas de *Candida* spp., isoladas em um estudo global, frente a equinocandinas, foi observado que os índices de resistência a essas drogas ainda é baixo e de evolução lenta como pode ser visto na Tabela 4 e 5 (PFALLER *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado no Ceará com cepas de *Candida* spp. não foi encontrada resistência à caspofungina (SILVA *et al.*, 2011).

Tabela 4: Atividade de Equinocandinas contra *Candida* spp. isoladas em um estudo global.

Espécie (n)	Agente Antifúngico	Nº de isolados de acordo com o MIC (µg/mL)										
		0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,50	1	2	4	≥8
<i>C. albicans</i> (4.283)	Ani	338	1.278	1.542	896	216	12		1			
	Cas	92	1.181	2.037	898	68	6	1				
	Mic	608	2.952	625	90	5	1	1				
<i>C. parapsilosis</i> (1.238)	Ani		1	2	1	1	14	49	319	765	86	
	Cas		2	5	31	126	545	399	113	16	1	
	Mic		2	2	1	10	66	261	676	220		
<i>C. tropicalis</i> (996)	Ani	41	254	493	173	24	7	1		3		
	Cas	17	318	482	161	12	4		1			
	Mic	46	400	375	149	17	6	1	2			

Ani- Anidulafungina. Cas- caspofungina. Mic- Micafungina. Fonte: PFALLER *et al.*, 2010, com modificações.

Tabela 5: Atividade de Equinocandinas contra *Candida* spp. isoladas na América Latina.

Espécie (n)	Agente Antifúngico	Nº de isolados de acordo com o MIC (µg/mL)										
		0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,50	1	2	4	≥8
<i>C. albicans</i> (533)	Ani	34	134	185	134	42	2			2		
	Cas	7	119	249	134	19	5					
	Mic	57	363	88	23				2			
<i>C. parapsilosis</i> (207)	Ani			1			2	10	61	123	10	
	Cas			2	5	24	81	77	16	1	1	
	Mic			1		1	19	50	109	27		
<i>C. tropicalis</i> (222)	Ani	5	39	111	47	6	5					
	Cas	2	61	110	42	5	2			1		
	Mic	6	79	91	39	4	2		1			

Ani- Anidulafungina. Cas- caspofungina. Mic- Micafungina. Fonte: PFALLER *et al.*, 2008, com modificações.

1.7 Caspofungina.

O espectro de fungos susceptíveis a equinocandinas é bem mais estreito quando comparado ao dos polienos ou azólicos, porém as equinocandinas mostraram-se excelentes no tratamento de *Candidíase*. A caspofungina é a droga protótipo desse grupo, é um lipopeptídeo cíclico semissintético que apresenta mecanismo de ação semelhante às outras equinocandinas. É ativa contra cepas de *Candida* spp., dentre elas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitanea*. Apresenta geralmente um efeito fungistático contra *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. versicolor* e *A. terreus*. Não apresenta efeito contra cepas de *Cryptococcus* spp. (HOFFMAN e WALSH, 2011; MAYR *et al.*, 2011).

Vários estudos clínicos têm sido realizados comparando a atividade da caspofungina com outros antifúngicos. A Caspofungina é mais efetiva, segura e é uma alternativa à anfotericina B para o tratamento de candidíase invasiva em recém-nascidos (MOHAMED *et al.*, 2012).

A utilização da caspofungina representa um importante avanço no cuidado de pacientes com infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida* spp. É um antifúngico valioso para a cobertura profilática de pacientes com leucemia ou receptores de transplante de fígado e ainda existe a possibilidade de ser combinada com outros antifúngicos para o combate de infecções fúngicas causadas por cepas de *Candida* spp. resistentes (MAYR *et al.*, 2011; CATTANEO *et al.*, 2011; DORIA *et al.*, 2011; OZ *et al.*, 2012).

A caspofungina apresenta atividade contra infecções causadas por *Aspergillus fumigatus* e possui potente ação contra biofilmes de *Candida* spp. (UPPULURI *et al.*, 2011; LEWIS 2011; LEWIS *et al.*, 2011).

Poucos efeitos colaterais estão presentes em pacientes em uso de caspofungina essa é uma vantagem quando comparada à anfotericina B. A caspofungina apresenta boa tolerabilidade em pacientes adultos e crianças (NGAI *et al.*, 2011).

Um dos fatores limitantes ainda do uso de caspofungina é o seu alto preço, no entanto o voriconazol, um azólico recentemente lançado para o combate de infecções fúngicas, também apresenta um custo elevado e a alternativa de hospitais públicos continua sendo o fluconazol e para cepas fúngicas resistentes utiliza-se a anfotericina B (AL-BADRIYEH *et al.*, 2012).

1.8 *Candida parapsilosis*.

A principal levedura isolada de infecções fúngicas continua sendo *C. albicans*, no entanto, *C. parapsilosis* tem emergido nos últimos anos, sendo um isolado comum em candidemias, em alguns grupos de pacientes, como neonatos, transplantados, pacientes recebendo nutrição parenteral é mais prevalente que *C. albicans* (ALANGADEN, 2011).

Surtos hospitalares causados por *C. parapsilosis* têm sido descritos com frequência e as principais fontes de infecção encontradas foram as mãos dos profissionais de saúde, infusões, biomateriais dentre outros. *C. parapsilosis* é a segunda ou terceira levedura mais isolada de hemoculturas em várias partes do mundo. É um patógeno comumente isolado no Brasil e no Ceará. *C. parapsilosis* apresenta capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos médicos, esses fatores contribuem para a disseminação e permanência dessa levedura em ambiente hospitalar. Diversos antifúngicos incluindo azólicos, poliênicos, flucitosina e echinocandinas apresentam atividade contra cepas de *C. parapsilosis* isoladas de infecções (GOMES *et al.*, 2010; MEDRANO *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2011).

Como exposto anteriormente é possível observar que a *C. parapsilosis* apresenta um comportamento de maior tolerância à caspofungina. Essa levedura tem CIMs mais elevadas que outras espécies como podem ser visto na Tabela 4 e 5. Cepas de *C. parapsilosis* isoladas no Ceará apresentaram CIMs elevados para a caspofungina quando comparados com *C. albicans* e *C. tropicalis* (SILVA *et al.*, 2011).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda que para o tratamento de infecções causadas por *C. parapsilosis* deverá ser utilizado fluconazol ou uma equinocandina seguida de fluconazol, devido ao fato dessas cepas apresentarem CIMs elevados para essa classe de drogas. No entanto após uma ampla revisão de casos de IFIs causadas por *C. parapsilosis* foi possível comprovar que as equinocandinas são efetivas no tratamento dessas infecções (KALE-PRADHAN *et al.*, 2012).

A importância clínica dos CIMs elevados não é completamente entendida e a relação do trinômio: *C. parapsilosis*-Caspofungina-Albumina ainda não está esclarecido e entendê-lo é essencial para garantir o efetivo tratamento de IFIs causadas por *C. parapsilosis*.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Avaliar a alteração da sensibilidade de *Candida parapsilosis* à caspofungina causada pela solução de albumina bovina 50 mg/mL.

2.2.Objetivos Específicos

Realizar teste de sensibilidade à caspofungina de *Candida parapsilosis* utilizando protocolo padrão em meio RPMI.

Realizar teste de sensibilidade à caspofungina de *Candida parapsilosis* utilizando protocolo padrão modificado em meio RPMI suplementado com albumina bovina 50 mg/mL.

Comparar estatisticamente o efeito da albumina na sensibilidade de *Candida parapsilosis* à caspofungina, através do teste de *t* de Student.

3 METODOLOGIA

3.1 *Micro-organismos*

Foram utilizadas 22 cepas de *Candida parapsilosis* pertencentes ao banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia de Leveduras do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

3.2 *Isolamento e purificação das cepas*

As cepas em estoque foram descongeladas e semeadas em ágar batata dextrose e incubadas a 37°C por 24/48h. Após o crescimento foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 24/48h, para garantir a pureza das cepas (GOMES *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2011).

3.3 *Identificação presuntiva e Confirmação da Identificação*

A identificação presuntiva e a pureza das cepas foram realizadas em meio cromógeno e incubadas a 35°C por 24/48h. Esse meio cromógeno identifica as cepas de leveduras de acordo com a cor produzida; verde: *C.albicans*, azul: *C.tropicalis*, violeta claro: *C. parapsilosis* e rosa: *C. krusei*. A confirmação das identificações foi realizada com o teste do microcultivo em ágar arroz com tween 80, onde se observou a micromorfologia característica (CUNHA *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011; VASCONCELOS Jr *et al.*, 2011).

3.4 *Preparação da Solução de Albumina 50mg/mL*

Para a realização deste teste foi produzida uma solução de albumina humana 50 mg/mL. No recipiente contendo caldo RPMI (INLAB-São Paulo) 10,5 g/L (Roswell Park Memorial Institute) tamponado com MOPS (Sigma- EUA) (ácido morfolino polissulfônico) 0,165 M foi acrescentado quantidade suficiente de Albumina Bovina (AB) (INLAB-São Paulo), para produzir uma solução de 50 mg/mL. Todos os testes de

sensibilidade foram realizados com essa solução, pois essa concentração mimifica o soro humano que contém 5,0 g/100 mL de albumina (50 mg/mL) (ARENDRUP *et al.*, 2011; GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011).

3.5 Agentes Antifúngicos

Neste estudo foi avaliado um único antifúngico a caspofungina (CAS) (Sigma-EUA). A CAS foi dissolvida em água destilada e diluída em RPMI e em RPMI/Albumina Bovina. O intervalo da concentração de CAS foi: 16 - 0,0075 µg/mL (ESPINEL-INGROF e CANTÓN 2007).

3.6 Teste de Sensibilidade pelo Método de Microdiluição em caldo RPMI

Ensaio de sensibilidade antifúngica foram realizados, de acordo com os documentos M27-A3 padronizados pelo CLSI. As soluções de antifúngicos foram diluídas em RPMI 1640 tamponado e colocadas em placas plásticas estéreis com 96 orifícios e estocadas a -20°C até o momento do uso (CLSI 2008a, CLSI 2008b). Foram produzidas placas com e sem albumina bovina.

As cepas de *C. parapsilosis* foram diluídas em salina e rediluídas em RPMI sem albumina e com albumina para produzir um inóculo de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Desse inóculo foram retirados 100 µL e inoculados nas placas com CAS e AB e nas placas com CAS. As placas foram colocadas a 35°C, decorrido 24 h e 48 h foi observado visualmente a menor concentração de antifúngico que causava uma redução de 50% e 90% no crescimento da *C. parapsilosis* quando comparado com o crescimento sem antifúngico. A essa concentração chamamos de CIM₅₀ e CIM₉₀. Como controles foram utilizados *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 (CLSI 2008a, CLSI 2008b).

3.7 Interpretação dos Resultados

Na avaliação dos resultados utilizamos os pontos de corte disponíveis para *C. parapsilosis*. O CLSI não disponibilizou ainda pontos de corte diferenciado por espécies no entanto, estudos mostram que a *C. parapsilosis* apresenta CIMs maiores para a

caspofungina. Utilizaremos os seguintes pontos de corte: Sensível ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ (S), intermediário 4 $\mu\text{g/mL}$ (I) e resistente ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ (R) (PFALLER *et al.*, 2011a).

3.8 Análise Estatística

As CIMs obtidas com a caspofungina sozinha e as obtidas com a caspofungina com albumina foram comparados e avaliados estatisticamente com o teste *t* de *Student* e um nível de significância de 5% foi utilizado. A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS.

3.9 Descarte das amostras

Todas as amostras foram re congeladas e guardadas sob a responsabilidade do Laboratório de Microbiologia de Leveduras da Universidade Federal do Ceará.

4. RESULTADOS

Cepas de *C. parapsilosis*, crescendo em ágar batata dextrose, são semelhantes a outras cepas de *Candida* spp. A identificação baseada na morfologia da colônia é impossível de ser realizada. *C. parapsilosis* é uma espécie bastante comum em infecções fúngicas e atualmente, com o avanço dos métodos de identificação, estas leveduras são cada vez mais isoladas de amostras de pacientes. Na Figura 4 podemos observar cepas de *C. parapsilosis* em meio ágar batata dextrose.

Figura 4: Cepas de *Candida parapsilosis* em meio ágar batata dextrose



A confirmação de identificação de cepas de *C. parapsilosis* pode ser realizada por diversos métodos, dentre eles: moleculares, fenotípicos ou bioquímicos. No nosso estudo, utilizamos testes fenotípicos para identificação.

A identificação foi realizada em meio cromógeno. Estes meios identificam as cepas baseados na coloração que elas adquirem após a inoculação. No caso das *C. parapsilosis*, as colônias produzem uma cor violeta, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 – *Candida parapsilosis* em meio cromógeno.



Todas as cepas acima são *C. parapsilosis*, com exceção da cepa de coloração azul. A confirmação da identificação foi feita pela técnica do microcultivo. Essa técnica se baseia na identificação de estruturas específicas de *C. parapsilosis*.

Os métodos utilizados no teste de sensibilidade são recentes e somente há cerca de dez anos vem se popularizando. Dos métodos disponíveis, o Etest® é o mais caro, porém fornece resultados de maneira rápida e confiável. O disco difusão não está disponível para todos os antifúngicos, mas é um teste rápido e de fácil realização. A microdiluição em caldo é um teste que exige pessoal qualificado, mas é o mais aceito internacionalmente pela sua reprodutibilidade.

A caspofungina, no nosso estudo, foi avaliada pelo método de Microdiluição em caldo. Na Figura 6,7 e 8 podemos observar a realização do teste de Microdiluição em caldo. O RPMI suplementado com albumina bovina 50 mg/mL, como pode ser visto na Figura 6, é um líquido amarelado e claro, que pode ser utilizado facilmente na realização dos testes de sensibilidade.

Figura 6- Caldos RPMI utilizados no teste de microdiluição, o frasco da direita contém RPMI e albumina, conferindo uma coloração amarelada.



Figura 7- Teste de sensibilidade da caspofungina pela técnica de Microdiluição em caldo.

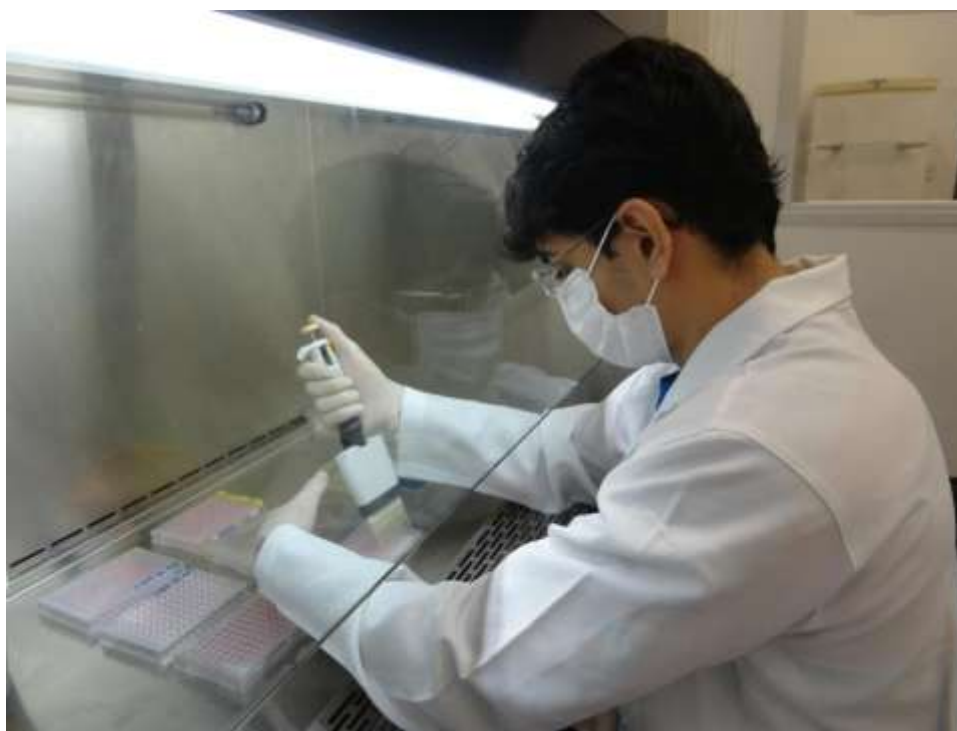
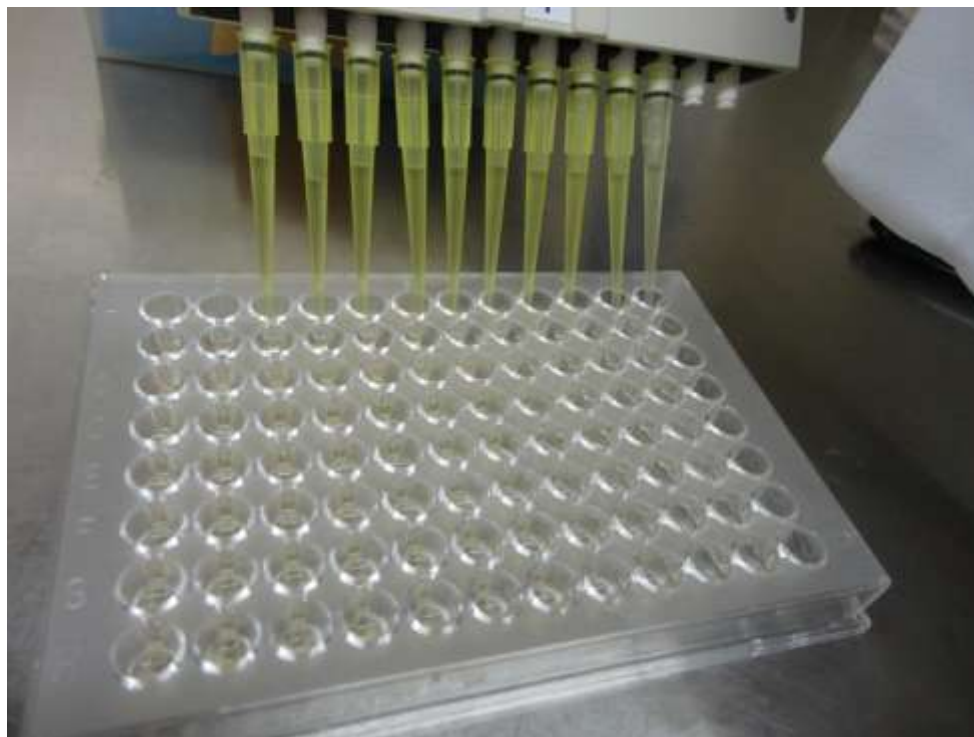


Figura 8: Inoculação de placas no teste de Mirodiluição em caldo



Demostramos no nosso trabalho que a albumina altera o Concentração Inibitória Mínima (CIM) da caspofungina contra cepas de *C. parapsilosis*, causando uma elevação das CIMs para essa droga. Na Tabela 6 podemos observar esse efeito comparado as CIMs_{50%}.

Tabela 6 - CIMs_{50%} da caspofungina de 22 cepas de *C. parapsilosis* testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 24 h.

Antifúngico	Intervalo (µg/mL)	MG	M	P
Caspofungina	≤0,007-0,25	0,03	0,007	0,0008
Caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL	≤0,03-1	0,18	0,12	

CIMs_{50%}: Concentração Inibitória Mínima de 50% do crescimento fúngico. MG: Média Geométrica das CIMs. M: Moda das CIMs. p= comparação das CIMs da caspofungina com as CIMs da caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL, foram estatisticamente diferentes e significativas pelo teste de *t* de Student com $p < 0,05$.

O efeito da albumina é mais pronunciado quando avaliamos a CIMs_{90%}. Observamos uma maior elevação das CIMs. Na Tabela 7 podemos perceber essa elevação.

Tabela 7 – CIMs_{90%} da caspofungina de 22 cepas de *C. parapsilosis* testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 24h.

Antifúngico	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	MG	M	P
Caspofungina	$\leq 0,015-0,5$	0,06	0,015	0,0005
Caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL	$\leq 0,06-2$	0,40	0,25	

CIMs_{50%}: Concentração Inibitória Mínima de 50% do crescimento fúngico. MG: Média Geométrica das CIMs. M: Moda das CIMs. p= comparação das CIMs da caspofungina com as CIMs da caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL, foram estatisticamente diferentes e significativas pelo teste de *t* de Student com $p < 0,05$.

As placas de microdiluição foram incubadas até 48 h e o efeito permaneceu como pode ser observado nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – CIMs_{50%} da caspofungina de 22 cepas de *C. parapsilosis* testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 48 h.

Antifúngico	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	MG	M	P
Caspofungina	0,015-0,5	0,16	0,25	0,001
Caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL	0,06-4	0,65	0,50	

CIMs_{50%}: Concentração Inibitória Mínima de 50% do crescimento fúngico. MG: Média Geométrica das CIMs. M: Moda das CIMs. p= comparação das CIMs da caspofungina com as CIMs da caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL, foram estatisticamente diferentes e significativas pelo teste de *t* de Student com $p < 0,05$.

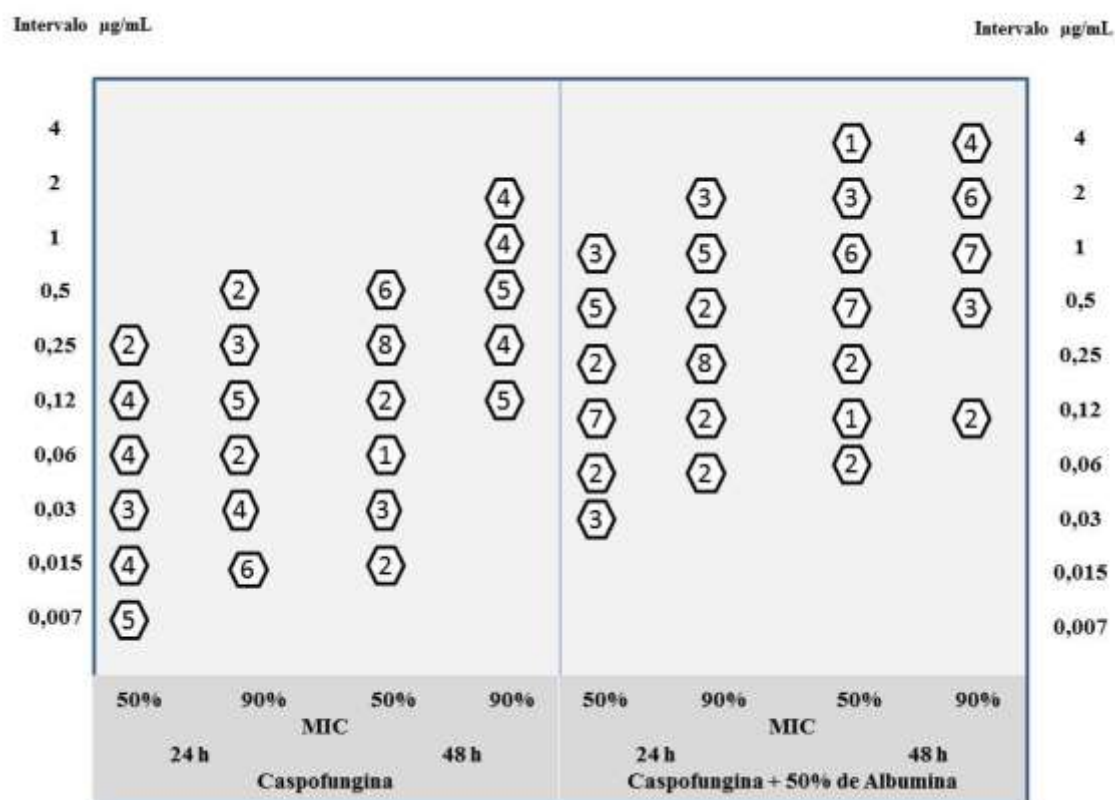
Tabela 9 – CIMs_{90%} da caspofungina de 22 cepas de *C. parapsilosis* testadas com e sem albumina. Com tempo de incubação de 48 h.

Antifúngico	Intervalo (µg/mL)	MG	M	P
Caspofungina	0,12-2	0,47	0,50	0,004
Caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL	0,12-4	1,17	1,00	

CIMs_{50%}: Concentração Inibitória Mínima de 50% do crescimento fúngico. MG: Média Geométrica das CIMs. M: Moda das CIMs. p= comparação das CIMs da caspofungina com as CIMs da caspofungina + Albumina Bovina 50 mg/mL, foram estatisticamente diferentes e significativas pelo teste de *t* de Student com $p < 0,05$.

A elevação pode ser confirmada pelos testes estatísticos realizados com os tipos de amostras testadas com e sem albumina humana. Na Figura 9 observamos o efeito da albumina bovina 50 mg/mL sobre todos os isolados.

Figura 9- Perfil de Sensibilidade a caspofungina de 22 Cepas de *C. parapsilosis* testadas em RPMI com e sem albumina. Cada casulo representa o número de cepas.



A elevação do CIM foi da ordem de 128 quando o teste é realizado com albumina bovina 50 mg/mL. Essa variação do CIM pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10- Relação entre a CIM50% (albumina)/CIM50% (sem albumina) obtidas para caspofungina contra as cepas de *C. parapsilosis* em 24h.

Espécies	Caspofungina		Relação ^c
	CIM ^a _{50%}	CIM ^b _{50%}	
1	0,125	1	8
2	0,125	0,5	4
3	0,0625	0,5	8
4	0,0625	0,5	8
5	0,03125	0,25	8
6	0,03125	0,25	8
7	0,03125	0,125	4
8	0,0078125	0,125	16
9	0,0078125	1	128
10	0,0078125	0,0625	8
11	0,0625	0,5	8
12	0,25	0,5	2
13	0,015625	0,0625	4
14	0,125	1	8
15	0,25	0,125	0,5
16	0,0078125	0,125	16
17	0,015625	0,125	8
18	0,015625	0,03125	2
19	0,0625	0,125	2
20	0,125	0,125	1
21	0,015625	0,03125	2
22	0,0078125	0,03125	4

a-CIM obtida sem albumina. b- CIM obtida com albumina 50 mg/mL. Razão entre CIMb/CIMa

5. DISCUSSÃO

As Infecções Fúngicas Sistêmicas (IFIs) são patologias complexas que resultam em elevada mortalidade entre pacientes com doenças hematológicas, neonatos, transplantados, pacientes com o HIV e outros grupos de pacientes imunodeprimidos. A terapia antifúngica empírica pode reduzir a mortalidade, mas estudos recentes indicam que a incidência de IFIs está aumentando e o uso de novas drogas no tratamento dessas patologias ainda é desapontador, com falhas em torno de 50% nos casos de aspergilose. A taxa de mortalidade pode chegar a 30% após 12 semanas de infecção com *Candida* spp e *Aspergillus* spp (LIU *et al.*, 2011; LEHRNBECHER, *et al.*, 2010; YILMAZ, *et al.*, 2009).

Uma pesquisa extensiva da literatura médica da América Latina parece mostrar que a incidência de IFIs endêmicas e oportunistas tem aumentado. O aumento das IFIs endêmicas está provavelmente relacionado com as mudanças na população (migração, turismo e crescimento da população), ao passo que a alteração na incidência de IFIs oportunista está associada com um aumento no número de pessoas em risco. Em ambos os casos, o início precoce e uso adequado de procedimentos diagnósticos podem melhorar o manejo de pacientes com IFI. O tratamento precoce das IFIs é fundamental para o sucesso clínico, estudos têm mostrado que atrasar o início da terapia antifúngica aumenta o risco de morte (LEWIS, 2012; SIFUENTES-OSORNIO, *et al.*, 2012).

O diagnóstico laboratorial de IFIs baseia-se na microscopia direta e detecção do agente etiológico em espécimes clínicos, no isolamento e identificação do agente patogênico em cultura ou a utilização de métodos imunológicos ou moleculares que permitam a identificação fúngica. Culturas microbiológicas são muitas vezes insensíveis ou de limitada utilização o que dificulta o diagnóstico laboratorial da IFIs, principalmente aquelas causadas por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (PAGANO, *et al.*, 2010).

A identificação de *Candida* spp. por meios de culturas convencionais são demoradas e imprecisas, consumindo tempo e nem sempre fornecendo resultados confiáveis quanto a espécie identificada (MENEZES, *et al.*, 2007). No nosso trabalho as cepas foram semeadas em meio ágar batata dextrose, no qual a identificação das espécies é impossível de ser realizada, todas as cepas apresentam as mesmas características: colônias brancas, com contornos irregulares, opacas e úmidas como pode ser observado na Figura 4. A identificação microscópica também não ajuda. São

evidenciadas células Gram-positivas, ovaladas e medindo de 5 a 7 μm , dados não mostrados. Todas essas características são comuns a todas as espécies de *Candida* spp.

Com o objetivo de minimizar o problema de identificação e acelerar o diagnóstico foram criados os meios cromógenos, capazes de identificar as espécies baseado na coloração que elas produzem quando crescem nesses meios. Na Figura 5 podemos observar que o meio foi capaz de identificar as cepas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Em um estudo multicêntrico realizado no Ceará durante dois anos, esse meio cromógeno foi capaz de identificar corretamente as espécies de *Candida* spp. isoladas de vários centro médicos (MENEZES, *et al.*, 2011).

Os meios cromógenos são capazes de identificar de forma presuntiva diversas leveduras como *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp (MENEZES *et al.*, 2012).

No nosso trabalho separamos, purificamos e identificamos 22 cepas de *C. parapsilosis*. Essa levedura é comumente isolada de IFIs (HORN *et al.*, 2009). MEDRANO, *et al.*, 2006, documentaram a importância dessa levedura no Ceará. Em um estudo com leveduras isoladas de urina, *C. parapsilosis* foi a terceira levedura mais isolada (GOMES, *et al.*, 2010).

Estudos anteriores realizados no Ceará revelaram a importância dessa levedura na epidemiologia de infecções fúngicas no Ceará (MENEZES, *et al.*, 2004; MENEZES, *et al.*, 2005; MENEZES, *et al.*, 2006; MENEZES, *et al.*, 2007).

O complexo *C. parapsilosis* é composto por três espécies de leveduras: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, elas são indistinguíveis por métodos fenotípicos ou bioquímicos, sendo diferenciadas apenas por métodos moleculares. No nosso estudo não diferenciamos essas espécies. No Brasil a maior prevalência é de *C. parapsilosis* (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Somente a identificação à nível de espécies de *Candida* spp. não é mais suficiente para instalação da correta conduta terapêutica, é necessário que se realize também o teste de sensibilidade a drogas antifúngicas. Três métodos estão disponíveis e padronizados: o Etest®, Disco difusão e Microdiluição em caldo. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens (PFALLER, *et al.*, 2012).

O teste de sensibilidade é trabalhoso e necessita de pessoal treinado para sua execução e interpretação, no entanto fornece resultados precisos quanto a CIM de cada droga testada. No nosso trabalho realizamos o teste com 22 cepas frente à caspofungina

(Figuras 6, 7 e 8). Esse trabalho consumiu tempo e teve custos que são as principais desvantagens desse método, por isso nem todos os laboratórios de análises clínicas o realizam. Devido a isso, deixamos de conhecer a susceptibilidade das cepas fúngicas e a utilização dos antifúngicos acaba sendo empírica ou simplesmente baseada na escolha do médico. O Farmacêutico é um dos profissionais aptos a realizar e interpretar os resultados desses testes, podendo contribuir de forma importante no manejo de pacientes com infecção fúngica.

Nos nossos testes realizados para a caspofungina todas as 22 cepas de *C. parapsilosis* apresentaram, após 24h de incubação, CIM_{50%} e CIM_{90%} de no máximo 0,25 e 0,5 µg/mL (Tabelas 7 e 8). Esses valores demonstram que a todas as cepas testadas no nosso estudo apresentaram sensibilidade à caspofungina. Em um estudo com 131 cepas realizados na Itália, *C. parapsilosis* apresentaram CIM bem mais altos, atingindo 4 µg/mL (BORGHI *et al.*, 2011). Essa diferença pode ser devido ao fato que na Itália o uso de caspofungina é mais intenso do que no Ceará.

SILVA, *et al.*, 2011, trabalhando com 17 cepas de *C. parapsilosis* isoladas no Ceará encontraram resultados semelhantes aos nossos. A CIM_{50%} máxima atingiu 0,5 µg/mL.

Em um teste com 124 cepas de *C. parapsilosis* isoladas no Brasil a CIM atingiu 2 µg/mL (GONÇALVES *et al.*, 2010).

As equinocandinas *in vitro* são menos ativas contra *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. lusitanae*; Esta menor atividade frente a *C. parapsilosis* tem sido associada a uma substituição de aminoácidos que ocorre naturalmente na unidade FKS da enzima alvo das equinocandinas. O surgimento de cepas de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* resistentes a caspofungina foram relatados em pacientes utilizando a droga (MAYR *et al.*, 2011).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda que para o tratamento de infecções causadas por *C. parapsilosis* deverá ser utilizado fluconazol ou uma equinocandina seguida de fluconazol, devido ao fato dessas cepas apresentarem CIMs elevados para essa classe de drogas. No entanto, após uma ampla revisão de casos de IFSs causadas por *C. parapsilosis* foi possível comprovar que as equinocandinas são efetivas no tratamento dessas infecções (KALE-PRADHAN *et al.*, 2012).

Em trabalho realizado com 118 cepas de *C. parapsilosis* isoladas de UTI e 184 de enfermarias, não foi encontrado nenhuma cepa resistente a caspofungina (PFALLER

et al., 2011b). Nosso estudo não revelou cepas resistentes mesmo após 48 h de incubação (Tabelas 8 e 9).

O principal objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito que a solução de albumina 50 mg/mL tem sobre as CIMs da caspofungina frente a cepas de *C. parapsilosis*. Nas Tabelas 6 a 10 e na Figura 9 é possível perceber que a albumina exerceu um profundo efeito nas CIMs da caspofungina. Os parâmetros farmacocinéticos da caspofungina podem explicar em parte o fenômeno observado no nosso estudo. A Caspofungina apresenta altas taxas de ligação (97%) com proteínas plasmáticas, especialmente albumina (BELLMANN 2007; LOUIE *et al.*, 2005). Em geral é bem aceito, que somente a droga livre é farmacologicamente ativa. Em teoria, drogas com elevada taxa de ligação protéica apresentariam dificuldade de atravessar os tecidos e membranas celulares e atingir o alvo da droga (ANDES 2003). No nosso estudo, uma das teorias propostas seria que a caspofungina se liga a albumina e não consegue exercer seu efeito ligando-se a enzima alvo na *C. parapsilosis*.

Na Tabela 6 observamos que a adição de albumina elevou a CIM significativamente ($p<0,05$). O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 9, onde se percebe que no meio com albumina as cepas atingiram CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$, fato não observado pela outras cepas na ausência de albumina bovina.

Um estudo indicou que a adição de 50 mg/mL de albumina sérica bovina aumentou a separação entre cepas de *Candida parapsilosis* selvagens e cepas mutantes (ARENDROP *et al.*, 2011). Essa diferenciação é fundamental, pois cepas mutantes que apresentam a mutação *fks* na enzima glucano 1,3- sintase são menos sensíveis à caspofungina e podem não responder ao tratamento. A utilização da albumina bovina no teste de sensibilidade pode ajudar a decidir se a caspofungina ou outras equinocandinas seriam a melhor escolha terapêutica.

GARCIA-EFFROM *et al.*, 2011, observaram que a eficácia das equinocandinas foi significativamente reduzida na presença de 50% soro humano ($p<0,001$). Os efeitos do soro humano no CIM_{50%} e CIM_{90%} foram mais pronunciados para anidulafungina e micafungina do que para caspofungina. No nosso estudo escolhemos albumina sérica bovina na concentração de 50 mg/mL, todas as CIMs quando comparadas foram diferentes estatisticamente ($p<0,05$). A eficácia da caspofungina foi reduzida na presença de albumina bovina.

ARENDRUP et al., 2011, observaram que a adição de albumina bovina elevou as CIMs, para todas as equinocandinas particularmente para anidulafungina e micafungina ($MIC_{50} \geq 32 \mu\text{g/mL}$), quando testadas contra cepas de *C. parapsilosis*. A CIM para a caspofungina atingiu $8 \mu\text{g/mL}$ quando foi realizado o teste com albumina bovina. A elevação da CIM foi observada para todas as espécies de *Candida* spp. estudadas, mas foi mais pronunciado quando testado contra *C. parapsilosis*. No nosso estudo, ocorreu uma elevação da CIM até $4 \mu\text{g/mL}$ quando o teste foi realizado com albumina bovina.

Se considerarmos que somente tem ação a droga livre, ou seja apenas 3% da caspofungina total agiria inibindo a enzima, era de se esperar que a elevação das CIM fosse de 200 a 500 vezes (GARCIA-EFFROM et al., 2011). O que observamos no nosso estudo é que a CIM subiu no máximo 128 vezes como mostrado na Tabela 10. ISHIKAWA, et al., 2009, avalia que parte da droga ligada também apresenta atividade.

ODABASI, et al., 2007, observaram que o soro humano eleva a CIM para a echinocandinas e não se correlaciona com o índice de ligação proteica. A CIM subiu até 16 vezes. No nosso estudo a elevação da CIM foi bem mais pronunciada.

A questão de ligação proteica para explicar a mudança nas CIMs da caspofungina também é controversa, pois o itraconazol apresenta 99,8% de ligação proteica e não parece ser afetado *in vitro* ou *in vivo* pela presença do soro e a ligação à proteínas não interferiu na atividade da droga (SCHAFFER-KORTING, et al., 1995).

Outro fato que pode explicar esse comportamento observado nesse estudo seria a ação da albumina sobre a enzima glucano sintase, tornando-a mais insensível a caspofungina e elevando as CIMs (PADERU et al., 2007).

A caspofungina apresenta uma concentração máxima de $9,9 \mu\text{g/mL}$, valor muito acima da CIM para as todas as cepas testadas, no nosso estudo, que variaram de 0,007 a $4 \mu\text{g/mL}$, no entanto se considerarmos que a caspofungina apresenta uma meia vida em torno de 12h, após esse período os níveis séricos cairiam para próximos da CIM, levando a relação AUC/CIM para 1, o que pode tornar a droga sem atividade contra cepas de *C. parapsilosis*. No entanto, a droga somente é administrada a cada 24 h, isso se deve ao efeito pós-antifúngico da caspofungina que pode durar 96 h (ANDES 2009).

Para as equinocandinas, o impacto desses agentes *in vitro* ou na atividade *in vivo* não é completamente entendido. Os diferentes efeitos séricos com essas três

equinocandinas podem explicar os diferentes regimes de dosagens dessas três drogas na prática clínica.

SARIBAS *et al.*, 2011, comprovaram que ocorreram modificações nas CIMs das echinocandinas quando testadas frente a *C. parapsilosis*, na presença de soro humano. Contudo, as implicações observadas pelas diferenças de CIMs na presença de albumina bovina 50 mg/mL permanecem incertas. Essas diferenças entre atividade *in vitro* e *in vivo* e efeitos do soro na ação das equinocandinas precisam ser estudados mais profundamente. A adição de albumina bovina RPMI 1640 pode ser considerada uma modificação do teste de suscetibilidade à equinocandinas (ARENDRUP *et al.*, 2011 GARCIA-EFFROM *et al.*, 2011. PADERU *et al.*, 2007)

Em resumo, foi observado que a albumina afeta fortemente as CIMs da caspofungina frente *C. parapsilosis*.

6. CONCLUSÕES

- Todas as *C. parapsilosis* apresentaram sensibilidade a caspofungina.
- A solução de Albumina Bovina 50 mg/mL elevou as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) da caspofungina.
- O efeito permaneceu após 24 h e 48 h de incubação.
- As CIMs da caspofungina obtidas com albumina foram estatisticamente diferentes das CIMs sem albumina.
- A elevação das CIMs foi da ordem de 128 vezes.
- O teste de sensibilidade com caldo RPMI suplementado com albumina pode ser útil na detecção de cepas de *C. parapsilosis* resistentes à caspofungina.

REFERÊNCIAS

- ALANGADEN, G.J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am*, v.25, n.1, p.201-25, 2011.
- AL-BADRIYEH, D. *et al.* Pharmacoeconomic analysis of voriconazole vs. caspofungin in the empirical antifungal therapy of febrile neutropenia in Australia. *Mycoses* v.55, p.244-256. 2012.
- ANDES, D. *In Vivo* Pharmacodynamics of Antifungal Drugs in Treatment of Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* v.47, p.1179-1186. 2003.
- ANDES, D. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antifungals. *Infect Dis Clin N Am* v.20, p.679–697. 2006.
- ARENDRUP, M.C. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Car* v.16, p.445-452, 2010.
- ARENDRUP, M.C., *et al.* Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 Standard Procedures: Analysis of the Influence of Bovine Serum Albumin Supplementation, Storage Time, and Drug Lots. *Antimicrob Agents Chemother*. v.55, p.1580-1587. 2011.
- BEER, J.; WAGNER, C.C.; ZEITLINGER, M. Protein binding of anti-microbials: methods for quantification and for investigation of its impact on bacterial killing. *AAPS J.* v.11, p.1–12. 2009.
- CATTANEO, C. *et al.* randomized comparison of caspofungin versus antifungal prophylaxis according to investigator policy in acute leukaemia patients undergoing induction chemotherapy (PROFIL-C study). *J Antimicrob Chemother* v.1, p.1-6.2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: informational supplement, M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008a
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI) 2008 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: informational supplement, M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008b.

- CUNHA, F.A.; MENEZES, EA.; MENDES, LG. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, p. 01-02, 2009.
- DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*. v.362, p.1142–1151. 2003.
- DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology* v.18, p.195-204. 2010.
- DINUBILE, M.J. Caspofungin: the First Licensed Antifungal Drug of the Novel Echinocandin Class. *Clinical Microbiology Newsletter* v.26, p.81-85. 2004.
- DORIA, C. *et al.* A retrospective analysis of the use of caspofungin in recipients of liver transplant with a modified high index of suspicion for fungal infection. A critical review of mortality, acute cellular rejection, infections, and changes in the liver function tests while on caspofungin. *Clin Transplant* v.25, p. 569–575. 2011.
- ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Edit: Schwalbe R. Steele-Moore L. Goodwin AV. Cap. 9. p.173-208. CRC Press. United State of America. 2007.
- GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Improved Detection of *Candida* sp. fks Hot Spot Mutants by Using the Method of the CLSI M27-A3 Document with the Addition of Bovine Serum Albumin. *Antimicrob Agents Chemother* v.55, p.2245–2255. 2011.
- GOMES, C.L. *et al.* Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. *Rev. Bras. Anal. Clin*, v. 42, n.3 p.223-225, 2010.
- GONÇALVES, S.S. *et al.* Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect* v.16, p.885–887. 2010.
- GLÖCKNER, A. *et al.* Treatment of invasive candidiasis with echinocandins. *Mycoses* v.52, p.476–486. 2009.
- GROLL, A.H.; TRAGIANNIDIS, A. Update on antifungal agents for paediatric patients. *Clin Microbiol Infect* v.16, p. 1343–1353. 2010.
- HOFFMAN, J.A.; WALSH, T.J. Echinocandins in Children. *Pediatr Infect Dis J* v.30, p. 508 –509. 2011

- HORN, D.L. *et al.* Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clin Infect Dis*, v.48, n.12, p.1695-703. 2009.
- ISHIKAWA, J., *et al.* Antifungal activity of micafungin in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.53, p.4559–4562. 2009.
- KALE-PRADHAN, P.B.; WILHELM, S.M.; JOHNSON, L.B.; Clinical Relevance of In Vitro Resistance of Echinocandins: a Focus on *Candida parapsilosis*. *Curr Fungal Infect Rep* v.55, p.1-5. 2012.
- KARTSONIS, N.A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates* v.6, p.197–218. 2003.
- KONTOYIANNIS, D.P. Invasive Mycoses: Strategies for Effective Management. *The American Journal of Medicine* v.125, p.S25–S38. 2012.
- LEHRNBECHER, T. *et al.* Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of Infection* v.61, p.259-265. 2010
- LEWIS, R.E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc* v.86, n.8, p.805-817, 2011.
- LEWIS, R.E. Importance of Pharmacokinetic Considerations for Selecting Therapy in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *American Journal of Therapeutics* v.19, p.51–63. 2012.
- LEWIS, R.E. *et al.* Comparative *in vivo* dose-dependent activity of caspofungin and anidulafungin against echinocandin-susceptible and –resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* v.66, p.1324-1331. 2011.
- LIU, X. *et al.* Invasive fungal infections in liver transplantation. *International Journal of Infectious Diseases* v.15, p.e298–e304 2011.
- MAYR A. AIGNER M. LASS-FLÖRL C. Caspofungin: when and how? The microbiologist's view. *Mycoses* v.55, p. 27-35. 2011.
- MEDRANO, D.J.A. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.48, n.1, p.17-20, 2006.
- MENEZES, E.A. *et al.* Isolamento de *Candida* spp no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 299-305, 2004.

- MENEZES, E.A. *et al.* Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 41, p. 9-13, 2005.
- MENEZES, E.A. *et al.* Frequency and enzymatic activity of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of HIV positive patients at Fortaleza, Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, p. 253-256, 2006.
- MENEZES, E.A. *et al.* Frequência e atividade enzimática de *Candida ssp* na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um Hospital em Fortaleza - CE. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 241-244, 2007.
- MENEZES, E.A.; CUNHA M.C.S.O.; CUNHA, FA. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Candida spp* em meio cromogeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará.. *Revista de Patologia Tropical* (Impresso), v. 40, p. 297-303, 2011.
- MENEZES, E.A. *et al.* Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, p. 1-3, 2012.
- MIGOYA, E.M. *et al.* Safety and Pharmacokinetics of Higher Doses of Caspofungin in Healthy Adult Participants. *J Clin Pharmacol* v.51, p.202-211. 2011.
- MOHAMED, W.; ABDEL, W.; MAHMOUD, I. Randomized, Double-Blind, Prospective Study of Caspofungin vs. Amphotericin B for the Treatment of Invasive Candidiasis in Newborn Infants. *J Trop Pediatrics* v.58, p. 25-30. 2012.
- MUELLER, M.; PEÑA, A.; DERENDORF, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* v.48, p.369-377. 2004.
- NGAI, A.L. *et al.* Overview of safety experience with caspofungin in clinical trials conducted over the first 15 years: a brief report. *International J Antimicrob Agents* v.38, p.540-544. 2011.
- ODABASI, Z.; PAETZNICK, V. ;REX, JH.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Effects of Serum on In Vitro Susceptibility Testing of Echinocandins. *Antimicrob Agents Chemoth* v.51, p. 4214-4216. 2007.

- OZ, Y.; DAG, I.; KIRAZ, N. Broth Microdilution and Time–Kill Testing of Caspofungin, Voriconazole, Amphotericin B and their Combinations Against Clinical Isolates of *Candida krusei*. *Mycopathologia* v.173, p.27-34.2012.
- PADERU, P. *et al.* Serum Differentially Alters the Antifungal Properties of Echinocandin Drugs. *Antimicrob Agents Chemoth* v.51, p. 2253-2256. 2007.
- PAGANO, L. *et al.* Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Reviews* v.24, p.51–61. 2010.
- PFALLER, M.A, *et al.* *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol*; v.46, p.150–6. 2008.
- PFALLER, M.A., *et al.* Comparison of EUCAST and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin.Microbiol.* v.48, p.1592–1599. 2010.
- PFALLER, M.A *et al.* Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resistance Updates* v.14, p.164-176. 2011a.
- PFALLER, M.A. *et al.* *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Intern J Antimicrob Agents* v.38, p.65-69, 2011b.
- PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med* v.125, p. S3–S13, 2012.
- RIZOS, E.C *et al.* Homophily and co-occurrence patterns shape randomized trials agendas: illustration in antifungal agents. *J Clinl Epidemiol* v.64, p.830-842. 2011.
- SARIBAS Z. *et al.* Influence of serum on *in vitro* susceptibility testing of echinocandins for *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*. *Mycoses* v.25, p.1-5.2011.
- SCHAFER-KORTING, M *et al.* Influence of serum protein binding on the *in vitro* activity of anti-fungal agents. *Infection* v.23, p.292–297. 1995.
- SIFUENTES-OSORNIO, J, ;CORZO-LEÓN, D.E.; PONCE-DE-LEÓN, LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep* v.6, p.23-34. 2012.

- SILVA, C.R. *et al.* Susceptibility to caspofungin of *Candida* spp. strains isolated in Ceará, Northeastern Brazil. *J Mycologie Medicale* v.21,p. 273-276. 2011.
- SHIELDS, R.K. *et al.* Five-Minute Exposure to Caspofungin Results in Prolonged Postantifungal Effects and Eliminates the Paradoxical Growth of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* v.55, p.3598-3602. 2011.
- UPPULURI P. *et al.* Effects of Fluconazole, Amphotericin B, and Caspofungin on *Candida albicans* Biofilms under Conditions of Flow and on Biofilm Dispersion. *Antimicrob Agent Chemother* v.57, p.3591-3593. 2011.
- VANDEPUTTE, P. ; FERRARI, S. COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology* v.1, p.1-26. 2012.
- VARSHNEY, A. *et al.* Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo be Utilized? *CHIRALITY* v.22, p.77–87. 2010.
- VASCONCELOS JÚNIOR, A.A. MENEZES, EA. CUNHA, FA. Chromogenic medium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. Isolated from urine. *Mycopathologia*, v. 172, p. 125-130, 2011
- YILMAZ D. *et al.* A rescue therapy with a combination of caspofungin and liposomal amphotericin B or voriconazole in children with haematological malignancy and refractory invasive fungal infections. *Mycoses* v.54 , p.234–242. 2009.
- ZEITLINGER, M.A. *et al.* Protein Binding: Do We Ever Learn? *Antimicrob Agents Chemother* v.55, p.3067-3074. 2011.