

Candidíase Experimental: estudo comparativo de dois métodos de coloração vital na determinação da viabilidade dos fungos em suspensão

Fátima Regina Vilani-Moreno*
Maria Sueli Parreira de Arruda**
Heloísa Helena Escudero*

VILANI-MORENO, Fátima Regina., ARRUDA, Maria Sueli P., ESCUDERO, Heloísa Helena. Candidíase Experimental: estudo comparativo de dois métodos de coloração vital na determinação da viabilidade dos fungos em suspensão. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 1, p. 139-142, 1999.

RESUMO

No presente estudo, comparou-se o percentual de viabilidade da Candida albicans em suspensão, utilizando-se dois métodos de coloração vital: o azul algodão e a associação entre os corantes fluorescentes diacetato de fluoresceína (DF) e brometo de etídeo (BE). A análise histológica das lesões induzidas por preparações, cuja concentração fúngica foi ajustada segundo cada um dos métodos, associado ao fato do percentual de células vivas indicado pelo método fluorescente ser cerca de 50% menor que o obtido através da coloração pelo azul algodão, sugere seu emprego ao invés da coloração pelo DF-BE em estudos envolvendo a determinação da viabilidade da Candida albicans em suspensão.

Unitermos: viabilidade fúngica, *Candida albicans*, métodos de coloração vital.

Nos últimos anos, temos estudado a participação da resposta imune no desenvolvimento da infecção provocada por diferentes agentes na bolsa jugal do hamster. Particularmente no que se refere à *Candida albicans*, observamos que, apesar de empregarmos o mesmo modelo experimental, estávamos obtendo resultados diferentes no que se refere à extensão e severidade das lesões. Considerando que essas divergências poderiam estar relacionadas à quantidade de fungos viáveis inoculados, nos

* Instituto Lauro de Souza Lima – Equipe Técnica de Imunologia – Rodovia Comte. João Ribeiro de Barros, Km 225/226 – 17001-970 – Bauru – SP.

** Faculdade de Ciências – Departamento de Ciências Biológicas – UNESP – Av. Engº. Luiz Edmundo Coube, s/nº. – 17033-360 – Bauru – SP.

propusemos a avaliar dois métodos de coloração vital na determinação da viabilidade da *Candida albicans* em suspensão.

Um dos métodos avaliados no presente estudo corresponde à associação entre o diacetato de fluoresceína (DF) e o brometo de etídeo (BE). O DF foi primeiramente utilizado por Rotman & Papermaster (1966) na determinação da viabilidade de células de mamíferos. Segundo os autores, as células vivas têm a propriedade de acumular fluoresceína no seu interior através da hidrólise enzimática do DF. O outro componente fluorescente, o BE, foi empregado por Edidin (1970) para detectar células danificadas ou mortas. O BE é capaz de penetrar rapidamente em células cuja membrana celular se encontra alterada, formando um complexo vermelho-alaranjado com o núcleo. A combinação desses dois corantes resulta em forte contraste entre células vivas (fluorescência verde) e células mortas (fluorescência laranja). Utilizada inicialmente por Takasugi (1971) em ensaios de citotoxicidade, essa associação foi posteriormente empregada por Calich *et al.* (1978), na determinação da viabilidade fúngica e, por Jarnagin & Luchsinger (1980) e Kvach & Veras (1982), para determinar a viabilidade de micobactérias.

Outro método ensaiado no presente estudo foi o da coloração pelo azul algodão (lactofenol). A escolha desse método teve por base principal o fato de que, em suspensões de *Paracoccidioides (P.) brasiliensis*, o percentual de viabilidade obtido através da coloração pelo azul algodão estava muito próximo ao método de contagem de colônias em placas, que é, sabidamente, eficiente para esse propósito (Sano *et al.*, 1993).

Para comparar a viabilidade da *Candida albicans* em suspensão através desses dois métodos de coloração, foram utilizadas culturas do fungo (Micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), mantidas por 24 horas, em ágar Sabouraud (Difco) a 37°C. As culturas foram suspensas em solução salina estéril (SSE) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão de células fúngicas ressuspensão em SSE.

Para a realização da coloração com DF-BE, uma solução estoque de DF (Sigma) foi preparada em acetona na concentração de 5,0mg/ml e mantida a -20°C; a solução de BE (Sigma) foi preparada em solução salina tamponada (SST), pH 7,2 na concentração de 5,0mg/ml e mantida a 4°C. Para uso, as soluções foram diluídas 1:100 em SST. Volumes iguais de solução DF-BE e de suspensão de fungos foram misturados e incubados a 37°C por 1 hora. Amostra desta mistura foi colocada em câmara de Neubauer e examinada em microscópio de fluorescência para a determinação da concentração de fungos viáveis presentes na suspensão. Foram considerados viáveis os fungos que apresentaram coloração verde-fluorescente e inviáveis os que se tornaram alaranjados.

Para a coloração por azul algodão, foi utilizada uma solução composta por 20g de ácido fênico (Merck), 20ml de ácido láctico (Merck), 40ml de glicerina (Inlab), 20ml de água destilada e 0,1g de azul-anilina (Difco). O corante foi diluído volume a volume com a suspensão de fun-

VILANI-MORENO,
Fátima Regina.,
ARRUDA, Maria
Sueli P.,
ESCUADERO,
Heloisa Helena.
Candidíase Experimental: estudo comparativo de dois métodos de coloração vital na determinação da viabilidade dos fungos em suspensão. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 1, p. 139-142, 1999.

VILANI-MORENO,
Fátima Regina.,
ARRUDA, Maria
Sueli P.,
ESCUADERO,
Heloísa Helena.
Candidíase Experi-
mental: estudo com-
parativo de dois mé-
todos de coloração
vital na determina-
ção da viabilidade
dos fungos em sus-
pensão. *Salusvita*,
Bauru, v. 18, n. 1,
p. 139-142, 1999.

gos e uma amostra foi examinada ao microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer. Os fungos corados em azul foram considerados viáveis (Sano *et al.*, 1993).

Utilizando-se a coloração DF-BE, obtivemos percentuais de viabilidade ao redor de 40%; empregando a mesma suspensão e utilizando a coloração pelo azul algodão, obtivemos percentuais de viabilidade acima de 80%. É possível que o baixo percentual de viabilidade obtido através da coloração pelo DF-BE esteja relacionado à hidrólise enzimática do DF, uma vez que a suspensão exibiu muitos fungos não corados que, conforme os dados obtidos com a coloração pelo azul algodão, estariam vivos; além disso, observamos diferenças na intensidade da fluorescência dos fungos viáveis.

De qualquer modo, a partir desses resultados, foram preparadas 2 suspensões contendo 5×10^6 fungos viáveis/ml: a primeira foi ajustada segundo os resultados obtidos através da coloração pelo DF-BE e a segunda de acordo com os dados encontrados através da coloração pelo azul algodão.

Para avaliar o comportamento dos fungos contidos nas duas preparações, 20 hamsters foram inoculados na bolsa jugal com 0,1ml de suspensão fúngica: 10 deles foram inoculados com a suspensão preparada segundo os dados obtidos com DF-BE e, os outros 10, com azul algodão. Os animais foram sacrificados às 24 horas, 3, 7 e 14 dias pós-inoculação. Em cada sacrifício, a bolsa jugal foi coletada e submetida aos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

Comparando os resultados obtidos nos dois grupos, verificamos que, com o ajuste da suspensão empregando a coloração pelo DF-BE, as lesões de inoculação eram muito severas, extensas e necróticas. A mesma suspensão ajustada pela coloração azul algodão induziu a formação de lesões menos severas, permitindo, inclusive, sua caracterização morfológica e seu estudo evolutivo. Resultados semelhantes foram obtidos por Sano *et al.* (1993) que, comparando diferentes métodos de coloração na viabilidade do *P. brasiliensis*, particularmente o DF-BE, mostraram ser o azul algodão o método mais sensível, exibindo valores de viabilidade muito próximos aos obtidos com o método de contagem de colônias em placas.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo e, aliado ao fato da coloração pelo azul algodão ser um método mais rápido e laboratorialmente mais simples, uma vez que não necessita de microscópio de fluorescência para a realização da contagem de fungos, sugerimos seu emprego ao invés da coloração pelo DF-BE em estudos envolvendo a determinação da viabilidade da *Candida albicans* em suspensão.

VILANI-MORENO, Fátima Regina, ARRUDA, Maria Sueli P., ESCUDERO, Heloisa Helena. Experimental candidiasis: comparative study of two vital staining methods for the viability determination of a fungi suspension. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 1, p. 139-142, 1999.

ABSTRACT

A comparative study of two staining methods to determine the cell viability of Candida albicans was carried out. The methods used were lactofenol cotton blue and fluorescein diacetate-ethidium bromide (FD-EB) staining. Results obtained in the histological evaluation of lesions induced by fungic suspension with the concentration adjusted to each staining method in 5×10^6 viables fungi/ml, associated to the fact that the percentage of the live cells indicated by fluorescent staining was 50% lower than by lactophenol cotton blue, indicate that this staining is useful for the cell viability determination of Candida albicans suspension.

Key Words: fungi viability, *Candida albicans*, staining method

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALICH, V. L. G., PURCHIO, A., PAULA, C. L. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, v. 66, p. 175-177, 1978.
- EDIDIN, M. A. A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J. Immunol.*, v. 104, p. 1303-1306, 1970.
- JARNAGIN, J. L., LUCHSINGER, D. W. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain technol.*, v. 55, p. 253-258, 1980.
- KVACH, J. T., VERAS, J. R. A fluorescent staining procedure for determining the viability of mycobacterial cell. *Int. J. Leprosy*, v. 50, p. 183-192, 1982.
- ROTMAM, B., PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 55, p. 134-141, 1966.
- SANO, A. et al. A Comparative study of four different staining methods for stimulation of live yeast form from cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathology*, v. 124, p. 157-161, 1993.
- TAKASUGI, M. An improved fluorochromatic cytotoxic test. *Transplantation*, v. 12, p. 148-150, 1971.

VILANI-MORENO, Fátima Regina., ARRUDA, Maria Sueli P., ESCUDERO, Heloisa Helena. Candidiase Experimental: estudo comparativo de dois métodos de coloração vital na determinação da viabilidade dos fungos em suspensão. *Salusvita*, Bauru, v. 18, n. 1, p. 139-142, 1999.