

---

*Resumo*

## Heterorresistência ao fluconazol em agentes de criptococose

Leticia Marielle Feliciano; Marcia de Souza Carvalho Melhem (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil, 2016

---

### RESUMO

Cepas de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* têm potencial para desenvolver resistência *in vitro* ao fluconazol (FCL), o que poderia explicar as constantes falhas terapêuticas e recidivas observadas em pacientes com criptococose e sob terapia com este fármaco. Heterorresistência é um fenômeno descrito como a emergência de uma subpopulação pequena de células resistentes, dentro de uma única colônia de uma cepa suscetível, que pode tolerar concentrações de FCL mais elevadas do que os níveis de CIM. O objetivo deste estudo foi investigar o nível de heterorresistência a FCL em 100 cepas, incluindo *C. gattii* e *C. neoformans* de origem ambiental e clínica (uma por paciente), provenientes de 3 coleções de culturas (19872013). O CIM de FCL foi determinado por microdiluição e, em seguida, o seu nível de heterorresistência ao FCL (NHF) foi avaliado. As suspensões celulares de todas as cepas foram inoculadas em placas de meio YPD contendo distintas concentrações de FCL (4 a 128 mg/L). O nível de heterorresistência (NHF) de cada isolado foi determinado pela maior concentração do fármaco que permitiu crescimento de subpopulações heterorresistentes; a partir destas, foram obtidas subpopulações altamente heterorresistentes em concentrações maiores do fármaco (até 256 mg/L). A estabilidade da heterorresistência foi analisada por transferência diária das subpopulações em meio de cultura isento de fármaco até a reversão para o NHF original. A cepa-padrão H99, com valores de CIM e NHF conhecidos, foi utilizada como controle do teste de heterorresistência. Os CIMs de FCL variaram entre 0,12 a 64 mg/L e foi demonstrado que todas as 100 cepas manifestaram heterorresistência (NHF entre 8 e 128 mg/L) com indução de até 256 mg/L. De 13 cepas avaliadas para estabilidade da heterorresistência, todas permaneceram estáveis até 9 passagens diárias em meio isento de FCL. Observou-se que o nível de heterorresistência a FCL foi cepa-dependente e em *C. gattii* maior do que em *C. neoformans*. Constatou-se que essa resposta adaptativa é estável com difícil reversão. O estudo sobre heterorresistência revela um mecanismo adaptativo para sobrevivência sob estresse de exposição ao FCL e pode oferecer informações úteis para compreensão da resistência observada em pacientes sob terapia azólica de longo prazo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus neoformans*.

Heterorresistência; Fluconazol. Concentração Inibitória Mínima. Antifúngicos.

*Abstract****Heteroresistance to fluconazole in cryptococcosis agents*****Leticia Marielle Feliciano; Marcia de Souza Carvalho Melhem (orientadora)**Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2016

---

**ABSTRACT**

Strains of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* have the potential to develop fluconazole (FCL) resistance in vitro, which could explain the therapeutic failure and relapses observed in Cryptococcosis patients undergoing therapy with this drug. Heteroresistance is a phenomenon described as the emergence of a resistant subpopulation of small cells within a single colony of a susceptible strain that can tolerate concentrations of FCL higher than CIMs. The objective of this study was to investigate the level of heteroresistance to FCL in 100 strains, including *C. gattii* and *C. neoformans* from environmental and clinical origin (one per patient) from 3 culture collections (1987-2013). The CIM was determined by microdilution FCL and the level of the FCL heteroresistance (NHF) was evaluated. Cell suspensions of all strains were inoculated in YPD medium plates containing distinct concentrations of FCL (4 to 128 mg/L). The level of heteroresistance (NHF) of each isolate was determined by the highest concentration of drug allowing growth of heteroresistant subpopulations; from these colonies the highly heteroresistant subpopulations were obtained at sequential higher drug concentrations (up to 256 mg/L). The stability of heteroresistance was analyzed by daily transfer of subpopulations onto culture medium-free drug to revert to the original NHF. The standard strain H99 with known CIM and NHF values was used as control in the heteroresistance test. The FCL-CIMs for the 100 strains varied between 0.12 and 64 mg/L and all 100 strains expressed heteroresistance (NHF between 8 and 128 mg/L) induced up to 256 mg/L. All 13 strains evaluated for stability heteroresistance remained stable up to 9 daily passes at free FCL culture medium. It was observed that the level of FCL heteroresistance was strain dependent and for *C. gattii* was higher than for *C. neoformans*. It was found that this adaptive response is stable with hard reversion. The heteroresistance study reveals an adaptive mechanism for survival under stress exposure to FCL and can provide useful information for understanding the resistance observed in patients ongoing long-term azole therapy.

**KEYWORDS:** *Cryptococcus gattii*; *Cryptococcus neoformans*. Heteroresistance; Fluconazole; Minimum Inhibitory Concentration; Antifungals.