

## MÉTODO FLUORESCENTE (DIACETATO DE FLUORESCÉINA E BROMETO DE ETÍDIO) PARA O ESTUDO DA VIABILIDADE DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS EM LÍQUOR

Benedito CORRÊA<sup>(1)</sup>, Adhemar PURCHIO<sup>(1)</sup>, Claudete R. PAULA<sup>(1)</sup>, Walderez GAMBALÉ<sup>(1)</sup>  
& Maria Aparecida SHIKANAI-YASUDA<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Padronizou-se método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína DF e brometo de etídio BE) para análise de viabilidade de células fúngicas, em 40 amostras de líquor, provenientes de casos comprovados de neurocriptococose. A utilização de solução aquosa de saponina a 0,3% eliminou fluorescências interferentes emitidas por hemácias e leucócitos. Após o processamento dos materiais biológicos, foram retiradas alíquotas de 0,1ml das suspensões obtidas e misturadas a volumes iguais da solução DF-BE preparada pouco antes do uso. O tempo de coloração ideal foi de 30 minutos, resultando perfeita diferenciação entre microrganismos viáveis (fluorescência verde) e não viáveis (fluorescência vermelha).

**UNITERMOS:** *Cryptococcus neoformans*; Viabilidade; Fluorescência.

### INTRODUÇÃO

Os métodos para avaliação da viabilidade de células fúngicas têm sido baseados no emprego de diversos processos de coloração (diretos ou por exclusão) ou, mais freqüentemente, no cultivo em meios apropriados<sup>19</sup>.

Com a evidenciação de que o diacetato de fluoresceína podia ser utilizado como indicador da viabilidade de células de mamíferos<sup>17</sup>, tendo como base a propriedade que possuem as células fúngicas de acumular a fluoresceína (fluocroma-

sia) abriu-se caminho para novas possibilidades como a determinação da viabilidade de culturas de fungos<sup>18</sup>, coloração fluorescente de bactérias<sup>1</sup> e de microrganismos do solo<sup>18</sup>.

Outro composto fluorescente, o brometo de etídio (BE) tem sido utilizado em teste citotóxico<sup>8</sup>. Esta substância possui a propriedade de penetrar rapidamente nas células danificadas, formando complexo fluorescente com o material nuclear, ligando-se ao DNA por intercalação, ocasionando, inclusive, anormalidades mitocondriais em inúmeros tipos de células, como as leveduras<sup>20</sup>.

(1) Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dr. Benedito Corrêa. Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. CEP 05508 São Paulo, SP, Brasil.

A combinação de ambas as substâncias fluorescentes (DF-BE) foi utilizada para determinar a viabilidade de micobactérias em cultivo<sup>10</sup>, biópsia de tecido<sup>11</sup> e de células fúngicas em cultivo<sup>2,4,5,6,7,15,16</sup>, salientando-se a sensibilidade e rapidez de execução desta técnica.

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo padronizar o método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para análise de viabilidade de *Cryptococcus neoformans* presentes em líquido, de pacientes portadores de neurocriptococose.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 40 amostras de líquido provenientes de pacientes com neurocriptococose diagnosticada mediante técnicas micológicas clássicas.

### Reagentes e soluções

A solução estoque de diacetato de fluoresceína (3,6, diacetil-fluoresceína-Sigma Chemical, USA) foi preparada em concentração final de 5 mg/ml de acetona e conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A solução estoque de brometo de etídio (2,7 diâmino, 10 etil, 9 fenil fenantridina-Sigma Chemical, USA) foi obtida em concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de solução tampão de fosfato (PBS) e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

No momento do uso diluiu-se a solução DF 2500 X e a de BE 20 X, ambos em PBS, misturando-se iguais, volumes das soluções diluídas.

### Processamento do material clínico

As amostras de líquido foram centrifugadas por 15 min. a 2000 rpm e os sobrenadantes removidos assepticamente com pipeta Pasteur. Ressuspendeu-se o sedimento com 3 ml de solução de saponina 0,3% (MERCK), deixando em repouso por 30 min. Findo o tempo determinado, novamente o material foi centrifugado, o sobrenadante removido, e o sedimento ressuspensionado com 1 ml de PBS.

### Preparação microscópica e cultivo para controle da viabilidade

Colocou-se uma alíquota do material processado entre lâmina e lamínula com tinta nan-

quim a 50%, sendo o cultivo efetuado em ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

### Teste de viabilidade com corantes fluorescentes

Após processamento das amostras de líquido, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml das suspensões obtidas e adicionadas 0,2 ml da mistura DF-BE (2,0  $\mu\text{g/ml}$  e 50  $\mu\text{g/ml}$ ), preparada pouco antes do uso.

As soluções foram submetidas a diversos períodos de contacto (5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos) e as suspensões incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  a fim de se propiciar maior intensidade de fluorescência no menor tempo de contacto.

Decorridos os tempos estipulados, colocou-se 1 gota da mistura entre lâmina e lamínula e examinou-se em microscópio de fluorescência.

### Estabelecimento das condições ideais para utilização da solução de saponina

Objetivando a eliminação de fluorescência interferente emitida principalmente por leucócitos e, eventualmente, por hemácias, presentes nas amostras de líquido, foi efetuado experimento com concentrado fresco de leucócitos. Prepararam-se várias diluições do referido material para efetuar contagens de células totais em Câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de toluidina para melhor diferenciação entre hemácias e leucócitos<sup>14</sup>. Os concentrados diluídos a 1/10, foram, em seguida, centrifugados e os sedimentos ressuspensionados com 3 ml de diversas concentrações de solução aquosa de saponina preparada momentos antes do uso e mantidas em repouso por diferentes períodos (10, 15, 20, 30 e 60 minutos). Em seguida, as soluções foram centrifugadas, desprezados os sobrenadantes e os sedimentos ressuspensionados com 1 ml de PBS sendo novamente submetidos à leitura em Câmara de Neubauer e ao teste fluorescente DF-BE.

As amostras foram consideradas não viáveis, pelo DF-BE, quando a totalidade das células apresentaram-se coradas, unicamente, pelo BE. Por outro lado, consideraram-se viáveis aquelas amostras que apresentaram, pelo menos, uma célula corada pelo DF.

Os cultivos por sua vez, foram analisados qualitativamente não sendo efetuado contagem das unidades formadoras de colônias.

Foram realizados testes controles “in vitro” com solução de saponina empregando-se suspen-

sões de *C. neoformans* frente às mesmas concentrações de solução de saponina anteriormente citadas, visando estudar a viabilidade do fungo após o tratamento.

## RESULTADOS

Verificou-se, após experimento desenvolvido com concentrado fresco de leucócitos, que 0,3 da referida solução durante 30 minutos proporcionou eliminação de hemácias com morte e degeneração de leucócitos.

Ensaíos controles “in vitro” de solução de saponina a 0,3% frente a suspensão de *C. neoformans* não resultaram na inibição do desenvolvimento de colônias fúngicas.

O teste de viabilidade com corantes fluorescentes mostrou células não viáveis de *C. neoformans* com fluorescência de tonalidade vermelha clara brilhante. Por outro lado, as células viáveis exibiram fluorescência esverdeada uniformemente distribuída nas células (Figura 1).

Após estudar diferentes períodos de contato entre as células fúngicas e as soluções de corantes (DF-BE) verificou-se que uma perfeita diferenciação entre células vivas e mortas foi obtida em 30 minutos.

Constatamos que a estrutura capsular não foi visualizada pelo método preconizado e tampouco constituiu-se em barreira para a penetração dos corantes fluorescentes, permitindo sua passagem em direção à célula propriamente dita.

Pela análise da Tabela 1 e Gráfico 1 pode-se inferir que: do total de amostras analisadas, 26 (65%) positivaram-se ao cultivo. Em relação ao

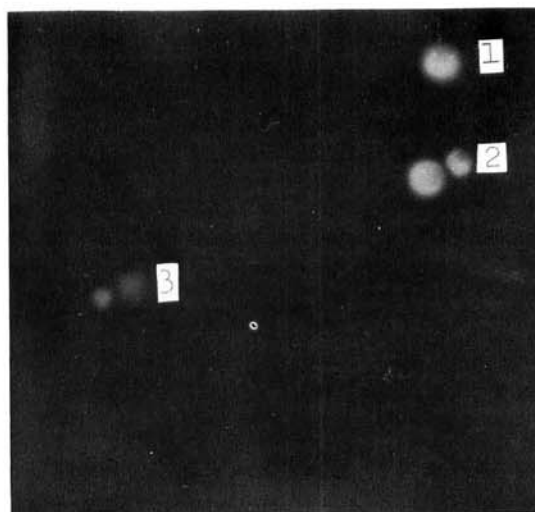


Figura 1 – Células leveduriformes viáveis (1 e 2) e não viáveis (3) de *Cryptococcus neoformans* presentes em líquido, após tratamento com solução de saponina, com incubação de 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (x1000)

método fluorescente (DF-BE) pode-se observar que este detectou células viáveis em 29 (72,5%) amostras. Em 11 (27,5%) o DF-BE somente detectou células não viáveis.

Embora 29 amostras tenham sido positivas ao DF-BE (viáveis), somente 26 resultaram positivas quando as mesmas foram submetidas ao cultivo.

TABELA 1

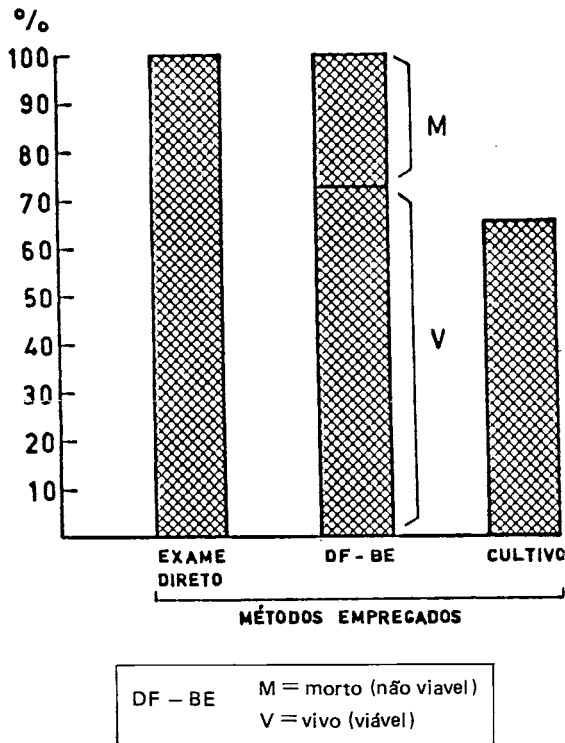
Exames micológicos e testes de viabilidade (DF-BE) realizados em 40 amostras de líquido provenientes de pacientes com neurocriptococose

Número de amostras analisadas	Exame direto +	Cultivo +	DF-BE	
			viáveis	não viáveis
40	40 (100)	26 (65)	29 (72,5)	11 (27,5)

( ) = percentual em relação a 40 amostras analisadas.

Obs.: As mesmas amostras positivas ao cultivo foram viáveis ao DF-BE.

Gráfico 1 – Percentuais de positividade em 40 amostras analisadas, segundo os métodos empregados



## DISCUSSÃO

A utilização de técnicas microscópicas no estudo da viabilidade de fungos apresenta a vantagem de economia de tempo, simplicidade, sensibilidade e não interferência de fatores ambientais e nutricionais<sup>9</sup>. Porém, a utilização de alguns corantes não permitem perfeita diferenciação entre células fúngicas vivas e mortas<sup>19</sup>.

A escolha do brometo de etídio como corante fluorescente de contraste baseou-se, principalmente, na demora de sua penetração, através da membrana plasmática intacta, devido a presença de microvilosidades.

A união do BE ao DNA (nuclear e mitocondrial) por intercalação<sup>20</sup> não interfere na penetração do diacetato de fluoresceína (DF) através da participação de esterases da parede celular<sup>12,17</sup>.

O corante, quando dissolvido em PBS, penetra lentamente nas células intactas de fungos e de mamíferos. Fato contrário ocorre em células danificadas onde há formação de fluorescência ver-

melha brilhante visualizada de maneira uniforme<sup>3,4,5,6</sup>.

Células viáveis de *C. neoformans* presentes no líquido, coradas pelo DF, apresentaram coloração esverdeada uniformemente distribuída nas células. Por outro lado, as não viáveis apresentaram fluorescência avermelhada brilhante. Estes padrões de coloração coincidiram com os achados analisando a viabilidade em cultivo<sup>2,4</sup>.

Devido à capacidade hemolisante da saponina<sup>13</sup> efetuou-se experimentos com diversas concentrações da substância a fim de eliminar fluorescência inespecífica emitida por hemácias e leucócitos.

Por outro lado, a saponina por ser hemolítica, poderia, eventualmente, apresentar atividade antifúngica, mas não se encontrou nenhuma menção deste fato na literatura e, tampouco os testes controles revelaram qualquer interferência.

Correlacionando o número de amostras positivas ao cultivo e ao DF-BE (viáveis), encontrou-se valores mais elevados com o método fluorescente. Tais achados são, portanto, indicadores de um limiar de detecção maior desse método, revelando-se pelo reduzido tempo para detecção de células fúngicas viáveis, importante indicador da viabilidade.

Outro detalhe que merece menção é que as mesmas 3 amostras negativas ao cultivo e positivas (viáveis) no DF-BE, eram oriundas de pacientes submetidos à terapêutica, fato este que talvez tenha colaborado para o não crescimento fúngico.

Pelo exposto, podemos afirmar que o método preconizado muito poderá contribuir nos estudos morfológicos de *C. neoformans* “in vivo” e “in vitro”, nas avaliações da atividade terapêutica e como consequência, do controle de cura de pacientes com neurocriptococose, pois é sensível, simples, apesar de mais oneroso.

## SUMMARY

### Fluorescein method (fluorescein diacetate and ethidium bromide) to study the viability of *Cryptococcus neoformans* in liquor

The utilization of the fluorescent method (fluorescein diacetate DF and ethidium bromide BE), to verify the viability of fungal cells, was studied in 40 samples of liquor, from patients with neurocryptococcosis. For removing leukocytes and red blood cells, which produce interfering fluorescence, good results were obtained with

0.3% saponin solution. After processing of liquor, 0.1 ml aliquots of resulting suspension were mixed to equal volumes of fresh DF-BE solution. The best incubation period for staining was 30 minutes, resulting in good differentiation between viable (green fluorescence) and non viable (red fluorescence) cells.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRUNIUS, G. – Technical aspects of the use of 3', 6 diacetyl fluorescein or vital fluorescent staining of bacteria. *Curr. Microbiol.*, 4:321-323, 1980.
2. CALICHI, V.L.G.; PURCHIO, A. & PAULA, C.R. – A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia (Den Haag)*, 66:173-177, 1978.
3. CORLISS, D.A. & WHITE Jr., W.E. – Fluorescence of yeast. Vital staining with ethidium bromide and propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.*, 29:45-48, 1981.
4. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C.R. & GAMBALE, W. – Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mycopathologia (Den Haag)*, 96:91-96, 1986.
5. CORRÊA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C.R. & GAMBALE, W. – Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of *Candida albicans* strain. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 18:258-263, 1987.
6. CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & CHACON-RECHIE, N.O. – Aplicação do método fluorescente (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de *Metarhizium anisopliae*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 20:341-349, 1989.
7. CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & PALAZZO, S. – Morfogênese de *Sporothrix schenckii* "in vivo" e "in vitro" através do método de viabilidade pela fluorescência. In: *Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 15., Anais. Ribeirão Preto, 1989. p.348.
8. EDIDIN, M. – A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J. Immunol.*, 104:1303-1306, 1970.
9. EUROPEAN BREWERY CONVENTION: Analytical microbiologica. Method. 2.2.2.3. Methylene blue staining. *J. Inst. Brewing*, 83:109-118, 1977.
10. JARNAGIN, J.L. & LUCHSINGER, D.W. – The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as stain for evaluation viability of Mycobacteria. *Stain Technol.*, 55:253-259, 1980.
11. KVACH, J.T.; MUNGUIA, G. & STRAND, S.H. – Staining tissue derived *Mycobacterium leprae* with fluorescein diacetate and ethidium bromide. *Int. J. Leprosy.*, 52:176-182, 1984.
12. MEDZON, E.L. & BRADY, M.L. – Direct measurement of acetylcholinesterase in living protest cells. *J. Bact.*, 97:402-415, 1969.
13. MERCK Laboratories: Chemical methods of medical investigation. 3.ed. Darmstadt, 1964. p.146.
14. MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A. & ALMEIDA, T.V. – *Técnicas de laboratório*. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. p.498.
15. RESTREPO, A.; CANO, L.E.; BEDOUT, C.; BRUMMER, E. & STEVENS, A.D. – Comparison of various techniques for determining viability of *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts form cells. *J. clin. Microbiol.*, 16:209-211, 1982.
16. ROJAS PEDRAL, M.M.E. & PURCHIO, A. – Avaliação da eficácia do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii*. *Rev. latino-americ. Microbiol.*, 30:197-200, 1988.
17. ROTMAN, B. & PAPERMASTER, B.W. – Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolyses of fluorogenic esteres. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:134-141, 1966.
18. SODESTRON, B.E. – Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.*, 9:59-63, 1977.
19. TREVORS, J.T.; MERRICK, R.I.; RUSSEL, I. & STEWART, G.G. – A comparison of methods for assessing yeast viability. *Biotech. Letters*, 5:131-134, 1983.
20. WARING, M.J. – Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. molec. Biol.*, 13:269-282, 1965.

Recebido para publicação em 14/4/1989.