AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FRAGMENTO PEPTÍDICO CTN [15-34] FRENTE A BIOFILMES DE CANDIDA SPP.

Antônia Dalila Oliveira Alves[1]
Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves[2]
Ana Caroline Rocha De Melo Leite[3]
Gabriela Silva Cruz[4]
Erika Helena Salles De Brito[5]

RESUMO

O gênero Candida é composto por leveduras potencialmente patogênicas e que podem causar doença em decorrência de um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro, já havendo relatos de candidíase acometendo indivíduos saudáveis. Muitos fatores estão relacionados com a patogenicidade e resistência a antifúngicos de Candida spp., entre estes, a formação de biofilme, permitindo maior capacidade de resistência a injúrias físicas e químicas. Nesse contexto, a evolução da resistência de fungos a agentes antimicrobianos já é uma realidade, e somada ao limitado número de antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíases, leva a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas, sendo os peptídeos antimicrobianos uma opção a ser testada. Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade antifúngica do fragmento peptídico Ctn [15-34], frente a células planctônicas e biofilmes de Candida spp. Para isso, foram utilizados isolados da microbiota oral de indivíduos saudáveis, de indivíduos portadores de HIV e de isolados clínicos diversos. A avaliação do perfil de sensibilidade de células sésseis será realizada utilizando biofilmes formados em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, onde foram adicionados RPMI- 1640 contendo diluições do antifúngico, com concentrações que variam de 5 e 1000 µM do fragmento peptídico Ctn[15-34]. A solução de XTT- menadiona foi utilizada para quantificar a atividade metabólica do biofilme. O fragmento Ctn [15-34] foi testado isolado, onde o efeito sinérgico foi determinado pela técnica do checkerboard. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.00, adotando-se um nível de significância de 5%, onde o valor de “p” foi menor de 0,05. A partir do presente estudo pode se concluir a eficácia do CTN (15-34) como inibidor

Palavras-chave: Resistência; Candidas; Antifúngicos; Peptídeo.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICS Instituto de Ciencias da Saude , Discente, dalilaoliveira017@gmail.com[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICS Instituto de Ciencias da Saude , Discente, aneliseal ves@unilab.edu.br[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICS Instituto de Ciencias da Saude , Docente, acarolmelo@unilab.edu.br[3]
Universidade Federal do Ceará, ICS Instituto de Ciencias da Saude , Discente, gabrielacruz.gc7@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICS Instituto de Ciências da Saúde , Docente, erika@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

Candida é um gênero de leveduras que vivem como sapróbios na microbiota de seres humanos e animais. Ele possui potencial patogênico que pode se manifestar em decorrência de um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro, sendo considerado oportunista, no entanto, espécies de Candida podem também causar enfermidades em indivíduos saudáveis, estando alguns fatores relacionados com a característica de patogenicidade das mesmas, entre estes, a formação de biofilme. Atribui-se à Candida spp. elevado poder de patogenicidade, em razão da expressão de uma série de fatores de virulência, tais como a adesão aos tecidos do hospedeiro diante da atividade de adesinas e invasinas; capacidade de adesão a dispositivos médicos; produção de enzimas hidrolíticas, como as proteases, fosfolipases e hemolisinas; mudança fenotípica; transição morfológica levedura-hifa e formação de biofilme.

Em relação ao biofilme, este é considerado uma comunidade de células aderentes e com propriedades distintas das células que estão livres e flutuantes (planctônicas). Essas comunidades complexas são envoltas por uma matriz composta por substância polimérica extracelular, produzidas pelos próprios microorganismos formadores de biofilme, aderida a superfícies bióticas (mucosa e tecido do hospedeiro) e abióticas (cateteres, próteses dentárias, etc.).

METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo descritivo e analítico com abordagem quantitativa. Descritivo porque visava determinar a distribuição de doenças ou condições relacionadas à saúde de uma população de acordo com o tempo, lugar e característica dos indivíduos e para isso, foram utilizados dados primários ou secundários (COSTA; BARRETO, 2003). Nos estudos quantitativos foi utilizada a análise estatística para que as informações encontradas resultem em dados de formato numérico. Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro- Brasileira – UNILAB, Redenção - Ceará, com apoio do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia (MarMoBio Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para este estudo, foram utilizadas 29 cepas de Candida, isoladas a partir da microbiota oral de indivíduos saudáveis, microbiota oral de indivíduos HIV positivos e isolados clínicos diversos. As cepas foram recuperadas a partir da micoteca do Centro de Estudos broncoalveolar); Candida krusei (uma de microbiota oral); Candida sp. (uma de microbiota oral), Candida tropicalis (três cepas de infecção urinária); Candida parapsilosis (uma cepa de hemocultura e uma de onicomicose).

Para a avaliação da atividade antifúngica de fármacos e do fragmento peptídico, foi realizado o Teste de Suscetibilidade a Antifúngicos, por método de Microdiluição em Caldo, de acordo com a Norma M27-A3, a qual descreve o método preconizado pelo Clinical Laboratory Standards (CLSI), instituição internacional que desenvolve normas e padrões para a realização de testes de patologia clínica e questões relacionadas à atenção à saúde

Para formação de biofilme a metodologia preconizada por Cordeiro et al. (2015), foi utilizada para avaliar a formação de biofilme poe uma cepa de Candida albicans. A cepa foi ressuspendida em meio RPMI e a suspensão ajustada até atingir a concentração de 1 x 106 células/mL. 200 µL deste inóculo serão transferidos para placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, e estas incubadas a 37ºC por 48 horas.

Para este estudo, foi utilizado o peptídeo Ctn [15-34] (sequência de aminoácidos - KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF), que é um fragmento C-terminal da Crotalicidina, derivado de uma catelicidina expressa nas glândulas de veneno da serpente sul- americana Crotalus durissus terrificus. Este já foi

ISSN: 2447-6161

previamente sintetizado, liofilizado e armazenado a uma temperatura de -20ºC.

Para a avaliação da sensibilidade dos biofilmes de Candida, foi utilizada a metodologia descrita por Bizerra et al. (2008), onde, após 24h de formação de biofilme, através de metodologia citada anteriormente, o meio foi aspirado e cada poço contendo biofilme foi lavado três vezes com PBS estéril. Em seguida, 200µL de RPMI-1640 contendo diluições seriadas de cada antifúngico foram adicionados aos poços contendo biofilme maduro, e as placas foram então incubadas por 48h a uma temperatura de 37ºC.

A quantificação do biofilme foi realizada após os ensaios de sensibilidade antifúngica. Os biofilmes das cepas (em formação e maduro) foram retirados das estufas após incubação de 48 ou 96 h, respectivamente. O sobrenadante foi aspirado e os poços lavados três vezes com 200 µL de TBS (0,05% Tween 20 em tampão Tris) para remoção dos microrganismos não aderentes. Então, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada.

Para a anpalise estatística foi empregada a análise de variância (ANOVA), adotando-se um nível de significância de 5%, onde o valor de “p” deverá ser menor de 0,05. Para a análise dos dados, será utilizado o programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.00.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela caracterização das cepas utilizadas para os testes foi verificado que que das 29 cepas testadas, 14 (48,3%) são originadas da microbiota oral de um indivíduo saudável, enquanto que 12 (41,4%) são de cepa clínica de indivíduos doentes, dessas, apenas uma amostra (3,4%) trata-se de uma cepa de referência, a ATCC 90028, resistente ao fluconazol. Duas das cepas utilizadas (6,9%) são cepas de pacientes com HIV+.

Foi possível verificar que as cepas C2 e C7 cepas de origem clinica apresentaram um maior percentual inibitório frente a resposta da utilização do CTN (15-34), e as cepas M13 e M4 cepas da microbiota de um indivíduo saudável, foram as que mostraram um menor percentual inibitório.

O estudo demonstrou que o peptídeo CTN (15-34) apresentou atividade inibitória eficaz contra os isolados de C. albicans se comparado a outros tipos de inibidores. As análises realizadas por outros autores, demonstraram a atividade inibitória do ToAP2 contra diferentes espécies do gênero como C. albicans (CIM 12.5 µM), C. parapsilosis (CIM 50 µM), C. tropicalis (CIM3.12 µM) e C. auris (CIM 50 µM) (DO NASCIMENTO DIAS et al., 2020; GUILHELMELLI et al., 2016; PINHEIRO et al., 2022), demonstrando o grande potencial inibitório do CTN (15-34).

Após a análise de inibição do biofilme, através da coloração com cristal violeta (CV) e avaliação da densidade óptica (OD) em espectrofotômetro, observou-se que concentrações intermediarias do peptídeo Ctn [15-34] obtiveram melhores resultados (gráfico - 1A e 1B). Verificou-se também, que o os valores entre 50 µM e 75 µM se mostram ideais para inibição de crescimento da cepa. Valores elevados (≥ 100 µM) e inferiores (≤ 5 µM) de Ctn (15-34) demostraram maior crescimento do biofilme.

Em relação a redução de biomassa (gráfico - 1C) os valores intermediários (50 µM - 75 µM) também demonstraram maior eficácia frente a outras dosagens. Feresin (2014) ao avaliar o efeito da atividade antifúngica de nanopartículas de prata observou que concentrações de 54 µM e 108 µM não foram efetivos na redução da biomassa total dos biofilmes simples de C. albicans ATCC 10231, entretanto, para o biofilme simples de C. glabrata ATCC 90030 formado sob agitação de 10 rpm, DC a 108 µg/mL e NPs nas concentrações de 108 e 54 µg/mL mostraram reduções significativas na biomassa total.

CONCLUSÕES

ISSN: 2447-6161

A partir dos resultados encontrados nesta pesquisa, concluímos que o objeto de análise mostrou efetividade em sua função pois através do estudo pode-se constatar que o peptídeo CTN (15-34) apresentou atividade inibitória eficaz contra os isolados de C. albicans se comparado a outros tipos de inibidores, mantendo um maior percentual inibitório perante o crescimento das leveduras, tanto em suas células sesseis como nas células em sua forma planctônicas. O CTN se mostra promissor no ambiente de estudo, os peptídeos mostram-se de grande valia nos campos de estudos por se tratarem de uma nova solução principalmente para os casos em que resistência medicamentos já existentes, e nos casos que o biofilme impossibilita a recuperação dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico FUNCAP que fomentou toda pesquisa e incentiva o crescimento e desenvolvimento da ciência no âmbito acadêmico, agradeço também a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira UNILAB que possibilita a muitos discentes o acesso a educação de qualidade e crescimento acadêmico, a orientadora Profa Dra Erika Helena Salles Brito uma grande profissional que impulsiona seus alunos ao expansão de saberes e busca por sempre mais conhecimento, agradeço a Doutoranda Gabriela Silva Cruz por seu apoio e participação ativa em todas as fases de teste tornando um membro essencial para realização desse estudo, e todos que colaboraram com a pesquisa.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, N. S.; CERCA, N. Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria. 1. ed. Porto: Publindustria, 2012.

BANDEIRA, I.C.J., BANDEIRA-LIMA, D., MELLO, C.P., PEREIRA, T.P.; MENEZES, R.P.B.; SAMPAIO, T.L.; FALCÃO, C.B.; MARTINS, A.M.C. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like vipericidin, found in Crotalus durissus terrificus rattlesnake's venom gland. Parasitology, 1-6: 2017.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; ESTIVALET SVIDZINSKI, T. I.; BORSATO QUESADA, R. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S.F. Characteristics of biofilm formation by Candida tropicalis and antifungal resistance. FEMS yeasts research, v. 8, n. 3, p. 442-50, 2008.

BRANDENBURG, L.; MERRES, J.; ALBRECHT, L.; VAROGA, D. PUFE, T. Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. Polymers v.4, p.539-560, 2012.

CAVALCANTE, C.S.P.; AGUIAR, F.L.L.; FONTENELLE, R.O.S.; MENEZES, R.P.B.; MARTINS, A.M.C.; FALCÃO, C.B.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] – a carboxyterminal, ccrotalicidin-derived peptide related to cathelicidins. J. Med. Microbiol., v.67, n.1, p.129-138, 2018.

CAVALCANTE, C.S.P.; FALCÃO, C.B.; FONTENELLE, R.O.S.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. Journal of antibiotics, v. 70, p. 231-237, 2016.

CAVALCANTE, C.S.P.; FALCÃO, C.B.; FONTENELLE, R.O.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragmente of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. J. Antibiot., v.70, n.3, p.231-237, 2017.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K. Candida biofilms: development, architecture and resistance. Microbiology Spectr., v.3, n.4, 2015.

ISSN: 2447-6161

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

CORDEIRO, R. DE A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P.; DE OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of Candida species and enhances their susceptibility to antifungals. FEMS Yeast Res., v. 15, n. 4, p. fov012, 2015.

FALCÃO, C.B.; LA TORRE, B.G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A.E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Vipericidins: a novel family of cathelicidin related peptides from the venom gland of South American pit vipers. Amino Acids, v.46, n.11, p.2561-71, 2014.

FALCÃO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; LA TORRE, B.G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M.A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ANDREU, D. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. J Med Chem, v.58(21), p.8553-8563, 2015.

FALSETTA, M.L.; KLEIN, M.I.; COLONNE, P.M.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; CHIA-HUA P.; GONZALEZ-BEGNE, M.; WATSON, G.; KRYSAN, D.J.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Symbiotic Relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans Synergizes Virulence of Plaque Biofilms In Vivo. Infection and Immunity. V.82, n.5, p. 19681981, 2014.

GULATI, M.; ENNIS, C.L.; RODEIGUEZ, D.L.; NIBILE, C.J. Visualizations oh biofilm formation in Candida albicans using na automated microfluid device. J. Vs. Exp., Janeiro, 2018.

KANG, S.J.; PARK, S.J.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.12, n.12, p.1477-86, 2014.

KERKIS, I; HAYASHI M.A.; SILVA, A.R.B.P.; PEREIRA, A.; SÁ JUNIOR, P.L.; ZAHARENKO, A.J.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; YAMANE, T. State of the Art in the Studies on Crotamine, a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake. BioMed Research International, 2014.

LEVETIN, E.; HORNER, W. E.; SCOTT, J. A.; WORKGROUP, E. A. Taxonomy of allergenic fungi. J. Allergy Clin. Immunol. Pract., v. 4, n. 3, p. 375–385, 2016.

LIM, C. S.; ROSLI, R.; SEOW, H.F.; CHONG, P.P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, v. 31, n. 1, p. 21- 31, 2012.

MELLO, C.P.; LIMA, D.B.; MENEZES, R.R.; BANDEIRA, I.C.; TESSAROLO, L.D.; SAMPAIO, T.L.; FALCÃO, C.B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A.M. Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in Bothrops atrox venom gland. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology, 130: 56-62.2017.

MOUNT, H. O.; REVIE, N. M.; TODD, R. T.; ANSTETT, K.; COLLINS, C.; COSTANZO, M.; BOONE, C.; ROBBINS, N.; SELMECKI, A.; COWEN, L. E. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. Plos genetics, v.14, n.4, 2018.

NG, S.M.S.; YAP, J.M; LAU, Q.Y.; NG, F.M.; ONG, E.H.Q.; BARKHAM, T.; TEO, J.W.P.; ALFATAH, M.; KONG, K.W.; HOON, S.; ARUMUGAN, P.; HILL, J.; CHIA, C.S.B. Structure-activity relationship studies of ultra-short peptides with potente activities agaibst fluconazole-resistant Candida albicans. European Journal of Medical Chemistry, 2018.

ISSN: 2447-6161