



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HELOISA FREIRE FROTA

**ATIVIDADE FUNGICIDA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, LYS-A1, E
SINERGISMO COM CETOCONAZOL CONTRA *Candida albicans* ATCC90028 e *C.
tropicalis* ATCC750.**

SOBRAL
2018

HELOISA FREIRE FROTA

ATIVIDADE FUNGICIDA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, LYS-A1, E
SINERGISMO COM CETOCONAZOL CONTRA *Candida albicans* ATCC90028 e *C.*
tropicalis ATCC750.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Biofilmes e peptídeos antimicrobianos.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F859a Fota, Heloisa.
ATIVIDADE FUNGICIDA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, LYS-A1, E SINERGISMO COM
CETOCONAZOL CONTRA *Candida albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750. / Heloisa Fota. –
2023.
49 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Sobral, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.
1. *Candida*. 2. peptídeo antimicrobiano. 3. cetoconazol. I. Título.

CDD 660.6

HELOISA FREIRE FROTA

ATIVIDADE FUNGICIDA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, LYS-A1, E
SINERGISMO COM CETOCONAZOL CONTRA *Candida albicans* ATCC90028 e *C.*
tropicalis ATCC750.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Biofilmes e peptídeos antimicrobianos.

Aprovada em: 20/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Nágila Carneiro Matos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo de maravilhoso que tem me proporcionado, agradeço pela força e determinação que tive para enfrentar todos os desafios desta caminhada.

Aos meus pais, Eliene e Raschid, pelo amor e apoio em todas as minhas decisões, por sempre estarem lutando para a minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Alves Carneiro, por ter acreditado no meu potencial e ter me guiado na realização deste trabalho, sempre disposto a ensinar, educar e orientar com responsabilidade àqueles que se dedicam e estão determinados a prosseguir.

Ao Dr. Eduardo Maffud Cilli pela parceria com este grupo de pesquisa e pela colaboração dada a este trabalho.

Aos professores do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará por todo o conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por terem me fornecido condições acadêmicas para a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Biofilmes e Agentes Antimicrobianos, pela estrutura e suporte disponibilizado a este projeto, e a todos os integrantes, em especial à Rafaela, Láina e Nagila pelos ensinamentos, amizade e convivência diária.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro concedido a este projeto, tanto na disponibilidade de bolsa, como na aquisição de materiais.

RESUMO

Nos últimos anos, um crescimento vertiginoso na incidência de infecções oportunistas ocasionadas por fungos do gênero *Candida* tem sido documentada em hospitais de todo o mundo. Esses fungos estão comumente relacionados à alta morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos/imunossuprimidos, ao aumento dos custos hospitalares com os cuidados médicos e aumento significativo no tempo de internação; todos estes fatos configuram um importante problema de saúde pública mundial. Os compostos azólicos, tais como cetoconazol (CETO), são utilizados contra esses tipos de micro-organismo, entretanto, mecanismos de resistência são relatados com frequência na literatura. Nesse sentido, peptídeos com atividade antimicrobianos (PAM) obtidos de diversos seres vivos representam uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas. Formas sintéticas análogas ao AMP Hilina a1 (Hy-a1), inicialmente isolado da espécie *Hypsiboas albopunctatus*, tem demonstrado excelente eficácia antimicrobiana, dentre os quais se destacam o peptídeo Lys-a1. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antifúngica do peptídeo Lys-a1 sobre o crescimento planctônico e biofilme de *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida tropicalis* ATCC750. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas para Lys-a1. Em seguida, foi determinado o efeito do PAM sobre o desenvolvimento do biofilme, analisando a biomassa, taxa metabólica, e alterações morfológicas sobre o biofilme pré-formado durante 72 horas para as duas leveduras. Por fim, foi considerado a influencia de Lys-a1 sobre a atividade de cetoconazol, para determinação de sinergismo por *checkerboard*. O peptídeo apresenta elevada atividade antimicrobiana sobre os microrganismos em questão, 31,25 e 3,9 µg/mL para *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida tropicalis* ATCC750, respectivamente. Para atividade antibiofilme o PAM, em concentrações de MIC, apresenta-se com parcial eficiência na eliminação do biofilme pré-formado. A interação das substâncias foi interpretada pelo índice de concentração inibitória fracional (ICIF) e mostrou um efeito sinérgico, estabelecendo uma diminuição de 300 vezes da CIM de CETO para as duas cepas testadas. Em conclusão, estes resultados sugerem este PAM isolado ou em combinação possui elevado potencial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Destacando a possibilidade do uso de menores concentrações de compostos azólicos para tratamento de candidíase.

Palavra-chave: *Candida*; peptídeo antimicrobiano; cetoconazol.

ABSTRACT

Candida is a pathogenic fungus associated with severe infections of difficult treatment, with a high morbidity and mortality rate. In some cases, yeasts may be in the form of cell clusters adhered to surfaces, called biofilms. Azole compounds, such as ketoconazole (KET), are used against these types of microorganisms, however, mechanisms of resistance are frequently reported in the literature. In this sense, peptides with antimicrobial activity (AMP) obtained from several living beings represent an alternative for the development of new drugs. Synthetic forms analogous to AMP Hilina a1 (Hy-a1), initially isolated from the species *Hypsiboas albopunctatus*, have demonstrated excellent antimicrobial efficacy, among them the Lys-a1 peptide. The objective of this work was to verify the antifungal activity of the Lys-a1 peptide on the planktonic growth and biofilm of *Candida albicans* ATCC90028 and *Candida tropicalis* ATCC750. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) were determined for Lys-a1. Then, the effect of AMP on biofilm development was determined by analyzing the biomass, metabolic rate, and morphological changes on the preformed biofilm for 72 hours for the two yeasts. Finally, the influence of Lys-a1 on the activity of ketoconazole, for determination of synergism by checkerboard was considered. The peptide has high antimicrobial activity on the microorganisms in question, 31.25 and 3.9 µg/mL for *Candida albicans* ATCC90028 and *Candida tropicalis* ATCC750, respectively. For antibiofilm activity the AMP, in concentrations of MIC, presents with partial efficiency in the elimination of the preformed biofilm. The interaction of the substances was interpreted by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and showed a synergistic effect, establishing a 300-fold decrease in KET MIC for the two strains tested. In conclusion, these results suggest that AMP alone or in combination has a high potential for the development of new therapeutic agents for the treatment of infectious diseases caused by *Candida albicans* and *C. tropicalis*. Highlighting the possibility of using lower concentrations of azole compounds for the treatment of candidiasis.

Keywords: *Candida*; antimicrobial peptide; ketoconazole

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Morfologia das formas de Levedura, hifa e pseudo-hifa. As barras de escala nos painéis principais representam 5 μ m, e na inserção no painel de hifas representa 1mm | 18 |
| Figura 2 - Fases da formação de biofilme de <i>Candida</i> . (A) Aderência inicial (B) Formação da camada basal de microcolônia (C) Biofilme maduro e matriz extracelular polimérica (D) Desprendimento e dispersão..... | 20 |
| Figura 3 - Estrutura química do Cetoconazol | 22 |
| Figura 4 - Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CFM da Lys-a1 e de CETO contra <i>C. albicans</i> ATCC90028 e <i>C. tropicalis</i> ATCC750, segundo o teste de microdiluição padronizado pelo CLSI | 28 |
| Figura 5 - Representação esquemática da metodologia de quantificação da biomassa do biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC90028 e <i>C. tropicalis</i> ATCC750 tratado com CETO e combinado com a Lys-a1. Fonte: modificado de OLIVEIRA, 2014..... | 29 |
| Figura 6 - Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CFM de CETO combinada com a Lys-a1 contra <i>C. albicans</i> ATCC90028 e <i>C. tropicalis</i> ATCC750, segundo a técnica de <i>Checkerboard</i> | 30 |
| Figura 7 - Quantificação de biomassa por cristal violeta (A) e taxa metabólica por redução de XTT (B) da formação de biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC90028 durante 24, 48 e 72 horas. Imediatamente antes da análise, cada grupo foi tratado com o agente antimicrobiano por uma 1 hora. ●/preto – controle; ▲/cinza claro – Lys-a1; □/cinza escuro – Cetoconazol). *(p>0,01) estatisticamente diferente em relação ao controle e # (p<0,01) estatisticamente diferente em relação a Lys-a1..... | 33 |
| Figura 8 - Quantificação de biomassa por cristal violeta (A) e taxa metabólica por redução de XTT (B) da formação de biofilme de <i>C. tropicalis</i> ATCC750 durante 24, 48 e 72 horas. Imediatamente antes da análise, cada grupo foi tratado com o agente antimicrobiano por uma 1 hora. □ ●/preto – controle; | |

▲/cinza claro – Lys-a1; □/cinza escuro – Cetoconazol. * (p>0,01) estatisticamente diferente em relação ao controle e # (p<0,01) estatisticamente diferente em relação à Lys-a1 34

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme de 24 horas de *Candida albicans* ATCC 90028 e *C. tropicalis* ATCC 750 após o tratamento antimicrobiano, lys-a1 e CETO, por 1 hora, e incubado por mais 24 h. *C. albicans* não tratado (A); *C. albicans* tratado com lys-a1 (B); *C. albicans* tratado com CETO (C); *C. tropicalis* não tratado (D); *C. tropicalis* tratado com lys-a1 (E); *C. tropicalis* tratado com CETO (F). Células viáveis (seta verde), hifas em lise (setas pretas), aparente produção de exopolissacarídeo (setas amarelas) 35

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | CIM e CFM do CETO e da Lys-a1 sobre as cepas <i>C. albicans</i> ATCC90028 e <i>C. tropicalis</i> ATCC750..... | 32 |
| Tabela 2 – | Valores e interpretação do ICIF de Cetoconazol combinado com a Lys-a1 contra <i>C. albicans</i> ATCC90028 e <i>C. tropicalis</i> ATCC750 | 36 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| AMP | Peptídeo Antimicrobiano (no inglês) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CFM | Concentração Fungicida Mínima |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CETO | Cetoconazol |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMEB | Concentração Mínima para a Erradicação de Biofilme |
| CPB | Concentração de Prevenção de Biofilme |
| CV | Cristal Violeta |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DO | Densidade Óptica |
| EPS | <i>Extracellular Polymeric Substances</i> |
| <i>et al</i> | Colaboradores |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| Hy-a1 | Hilina a1 |
| IACS | Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde |
| ICIF | Índice de Concentração Inibitória Fracional |
| IN | Infecção Nosocomial |
| Leu | Leucina |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| Lys | Lisina |
| Lys-a1 | Lys-[Trp ⁶]hy-a1 |
| M | Concentração molar |
| Mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| MSCRAMMs | Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules |
| Nm | Nanômetro |
| PA | Para Análise |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |

| | |
|---------|--|
| QS | <i>Quorum Sensing</i> |
| RP-HPLC | <i>Reversed phase - High Performance Liquid Chromatography</i> |
| TLR | Toll-like receptors |
| Trp | Triptofano |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho |
| UTI | Unidade de Tratamento Intensivo |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|----------------------------|
| % | Porcentagem |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| C | Carbono (elemento químico) |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| H | Hora |
| G | Gravidade |
| < | menor que |
| > | maior que |
| \leq | menor ou igual |
| NaCl | Cloreto de sódio |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2.2 | INFECCÕES POR <i>CANDIDA</i> | 17 |
| 2.1 | Características gerais de <i>Candida</i> | 17 |
| 2.2 | Fatores de virulência e formação do biofilme | 19 |
| 2.3 | Mecanismos de resistência | 21 |
| 2.4 | Drogas antifúngicas | 22 |
| 2.5 | Peptídeos antimicrobianos | 23 |
| 2.6 | Peptídeo Lys-a1..... | 24 |
| 3 | OBJETIVO | 25 |
| 3.1 | Objetivo geral | 25 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 25 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 | Preparação da solução do peptídeo | 26 |
| 4.2 | Preparação e armazenamento do antifúngico | 26 |
| 4.3 | Cepas microbianas e condições de cultivo | 26 |
| 4.4 | Ensaio de atividade antimicrobiana | 27 |
| 4.5 | Ensaio de susceptibilidade do biofilme pré-formado..... | 28 |
| 4.6 | Quantificação da biomassa | 28 |
| 4.7 | Ensaio de avaliação de atividade metabólica das células por XTT | 29 |
| 4.8 | Microscopia Eletrônica de Varredura | 30 |
| 4.9 | Ensaio de <i>checkerboard</i> | 30 |
| 4.10 | Análise estatística | 31 |
| 5 | RESULTADOS | 32 |
| 5.1 | Determinação de CIM e CFM | 32 |
| 5.2 | Susceptibilidade do biofilme pré-formado..... | 32 |
| 5.3 | Determinação do ICIF | 35 |
| 6 | DISCUSSÃO | 37 |
| 7 | CONCLUSÃO | 41 |
| | BIBLIOGRAFIA | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos microrganismos naturalmente tende a formar agregados microbianos, formando comunidades altamente organizadas denominadas de biofilme (HØIBY, 2017). A formação de biofilme é o modo preferido de estilo de vida de crescimento para muitos microrganismos, incluindo patógenos humanos bacterianos e fúngicos (SANTOS *et al.*, 2018). Os biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos devidamente organizados (como um típico sistema de cooperação social) ligados a um substrato inerte ou vivo e embutido em uma matriz extracelular autoproduzida (também chamada de substância polimérica extracelular) composta de glicoproteínas, glicolipídios, mono/polissacarídeos, DNA extracelular, minerais e água, que funciona como um adesivo favorecendo interações célula-célula e célula-substrato. Além disso, a matriz extracelular do biofilme pode conter componentes derivados do hospedeiro, como soro humano, glicoproteínas da saliva e excreções vaginais (STOODLEY *et al.*, 2002; FLEMMING *et al.*, 2010; LI E LEE, 2017).

Estas estruturas ocorrem em uma ampla gama de ambientes, sejam eles bióticos ou abióticos, gerando alguns benefícios ao homem, como no tratamento de água e efluentes e na indústria produtora de alimentos fermentados. No entanto, ocasionam prejuízos por serem responsáveis por danos na indústria alimentícia, causando deterioração dos alimentos e reduzindo a qualidade dos produtos, pela biocorrosão de equipamentos e, sobretudo na saúde do homem, por ocasionarem infecções de difícil tratamento, em razão de sua resistência aos antibióticos comumente utilizados. As células que compõem o biofilme podem apresentar capacidade de resistência a substâncias antimicrobianas de até 1000 vezes superior as suas respectivas formas planctônicas (CHEN, 2011; LI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2013; TOMIČIĆ *et al.*, 2017).

Candida é um gênero de microrganismo comensal da microbiota humana, e corresponde ao principal fungo patógeno capaz de causar infecções disseminadas ou crônicas. Sendo a quarta causa de infecção hospitalar em hospitais do Brasil (COLOMBO *et al.*, 2007). Essas infecções geralmente apresentam índice elevado de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes críticos e indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes submetidos a terapias anticancerígenas e transplantados (SUDBERY, 2011; LIU *et al.*, 2016).

O dimorfismo presente em *C. albicans*, caracterizado pela transição de levedura para hifa, e a capacidade de formar biofilmes são importantes características associadas à virulência desse fungo (POLKE *et al.*, 2017). O atributo fenotípico mais notável das células

dentro de um biofilme é a diminuição da sensibilidade a medicamentos antifúngicos, consequentemente causando resistência a medicamentos frequentemente utilizados, tais como os compostos azólicos (CHANDRA *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, os peptídeos antimicrobianos que são um grupo heterogêneo de moléculas encontradas em muitos organismos, desde microrganismos a mamíferos, apresentando ampla atividade antibacteriana e antifúngica, representam assim uma alternativa para aplicações terapêuticas no combate a infecções causadas por espécies de *Candida* (DA SILVA *et al.*, 2012).

O peptídeo Lys-a1, sintético derivado do peptídeo antimicrobiano Hilina a1, inicialmente isolado das espécies de rãs *Hypsiboas albopunctatus*, foi sintetizado com algumas modificações estruturais em relação ao peptídeo original. Estas modificações ocorreram no N-terminal da molécula, onde foi acrescentada uma lisina, e também pela substituição de uma leucina por um triptofano na posição 6. Essas mudanças resultaram em um peptídeo com um acréscimo na sua carga positiva e, provavelmente, por consequência aumentando a atividade antibacteriana e antifúngica e reduzindo os efeitos citotóxicos contra células humanas em comparação com o análogo Hy-a1 (CRUSCA *et al.*, 2011; DA SILVA, *et al.*, 2012).

Na busca por uma alternativa para terapias e/ou fármacos que impliquem na redução do uso de compostos azólicos, o uso de peptídeos sintéticos antimicrobianos pode ser contributivo para o desenvolvimento de novas agentes antifúngicas.

2 INFECÇÕES POR *CANDIDA*

As infecções fúngicas representam um grave problema de saúde pública devido à alta taxa de morbidade e mortalidade. Os indivíduos susceptíveis incluem os pacientes pós-cirúrgicos e em unidades de cuidados intensivos, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes submetidos a terapias anticancerígenas e transplantados, idosos, prematuros e sob tratamento com antibióticos de amplo espectro e medicamentos imunossupressores (MORA-NAVARRO et al, 2015).

Uma das infecções mais comuns é a candidíase, causada principalmente por *Candida albicans*, a levedura frequentemente isolada (BROWN et al., 2012). A candidíase abrange uma série de manifestações clínicas diferentes, desde as superficiais e mais leves a graves. Dentre as infecções leves, a candidíase vulvovaginal afeta pelo menos uma vez na vida 75% das mulheres e a candidíase esofágica e orofaríngea acometem principalmente pacientes com síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). As infecções graves incluem as sanguíneas, conhecidas como candidemia, que pode se desenvolver em candidíase disseminada quando a infecção se espalha para os órgãos internos (SUDBERY, 2011, YAPAR, 2013). A taxa de mortalidade causada por esse microrganismo é alta, com valores percentuais variando de 10% a 15% em crianças e 15 a 25% em adultos (BARBOSA et al, 2017).

Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico e tratamento, candidemia e candidíase disseminada que são condições médicas extremamente graves, estão associadas à alta taxa morbidade e mortalidade em pacientes criticamente doentes e imunocomprometidos. Assim como aumentos na duração da permanência e custo hospitalar, que se acredita exceder 2 bilhões de dólares nos Estados Unidos por ano (CLEVELAND et al., 2012, STROLLO et al., 2017).

Vale ressaltar, que as espécies de *Candida* podem facilmente formar biofilme em superfície de cateteres e outros dispositivos médicos, considerada uma das principais causas de infecções relacionadas ao biomaterial. Os Institutos Nacionais de Saúde relataram que os biofilmes são responsáveis por mais de 80% de todas as infecções microbianas nos Estados Unidos (LIU et al, 2016).

2.1 Características gerais de *Candida*

Candida é um gênero de fungos patogênicos do filo dos deuteromycota encontrado em diversas partes do corpo humano, como a pele, cavidade oral, trato gastrointestinal e geniturinário. As espécies representantes desse gênero possuem células polimórficas, com

capacidade de crescer na forma de levedura (blastoporos), que são esféricas a forma oval e têm aproximadamente 2-5 μm de tamanho e na forma filamentosa, como hifas e pseudo-hifas (Figura 1) (RIVERA *et al.*, 2005; SUDBERY, 2011).

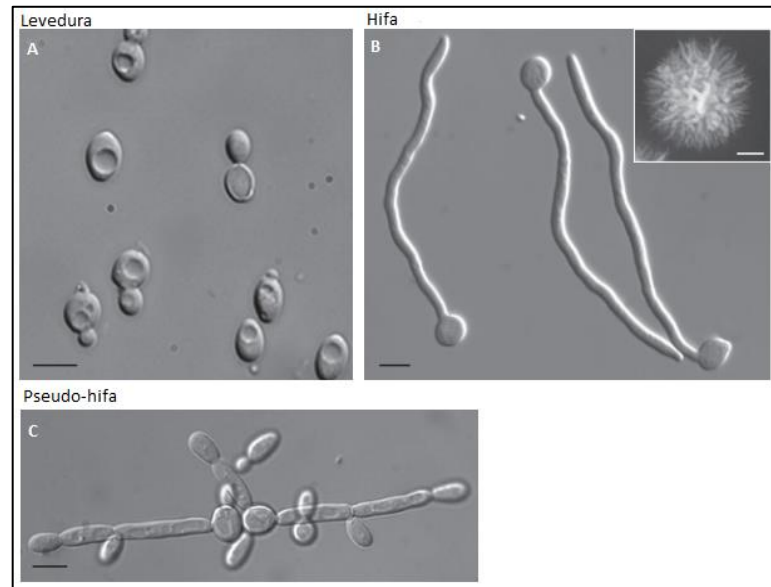


Figura 1 – Morfologia das formas de *C. albicans* (A), hifa (B) e pseudo-hifa (C). Fonte: modificado de SUDBERY, 2011.

É um grupo heterogêneo com mais de 150 espécies, porém apenas um pouco mais de 20 espécies são responsáveis por causarem doenças infecciosas humanas (ARAÚJO *et al.*, 2017). Com a capacidade de causar infecções superficiais e sistêmicas, as infecções fúngicas surgiram como importantes problemas de saúde pública, pois está associada à alta morbidade e mortalidade em pacientes criticamente doentes e indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes submetidos a terapias anticancerígenas e transplantados (POLKE *et al.*, 2017; LIU X *et al.*, 2016).

Candida albicans é principal patógeno fúngico do gênero, é o organismo frequentemente mais isolado de pacientes com candidíase sistêmica. No entanto, devido ao uso indiscriminado de antibióticos e antifúngicos de amplo espectro combinados com terapias imunossupressoras, as espécies de *Candida* não-*albicans* (do inglês non-*C. albicans* *Candida* - NCAC), dentre elas *Candida tropicalis*, emergiu como o segundo ou terceiro agente mais comum da candidemia, principalmente em pacientes oncológicos, e frequentemente está associado a infecções nosocomiais no trato urinárias. (FRIDKIN *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2012b; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

2.2 Fatores de virulência e formação do biofilme

A patogenicidade das espécies de *Candida* é potencializada por uma série de fatores de virulência, incluindo dimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas (como proteases, lipases e hemolisinas) e a capacidade de aderir e formar biofilme em uma ampla variedade de superfícies (LIU *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2017).

O dimorfismo em *C. albicans* refere-se à transição da levedura para forma filamentosa, podendo ser reversível de acordo com fatores ambientais. A transição é um dos fatores de virulência, pois aumenta a capacidade do microrganismo para invadir os tecidos do hospedeiro, visto que as hifas podem atravessar a barreira tecidual por secretarem enzimas que degradam proteínas, lipídios e outros componentes celulares (RIVERA *et al.*, 2005).

As espécies de *Candida* são capazes de produzir e secretar várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, fosfolipases, lipases e hemolisinas (PAKSHIR *et al.*, 2013). A função dessas enzimas está associada à adesão, ao dano celular e à invasão do tecido hospedeiro. Dentre as proteases, aspartil proteinases (Saps) são secretadas tanto por *C. albicans* como por *C. tropicalis*. As Saps facilitam a colonização e a invasão dos tecidos através da ruptura das membranas das mucosas do hospedeiro, degradando importantes proteínas de defesa imunológica e estrutural (SILVA *et al.*, 2011). As fosfolipases hidrolisam uma ou mais ligações éster nos glicerofosfolídeos de membrana celular, facilitando assim a invasão do epitélio da mucosa hospedeira (SINGHAI *et al.*, 2012). As lipases são capazes de catalisar reações, como hidrólise e síntese de triacilgliceróis, na qual aumentam a adesão do fungo a célula do hospedeiro, modulam reações inflamatórias, medeiam a aquisição de nutrientes (TOTH *et al.*, 2017). As espécies de *Candida tropicalis* são capazes de produzir PL, entretanto em níveis mais baixos em comparação com as espécies de *C. albicans* (SILVA *et al.*, 2011). Hemolisinas são produzidas para destruir hemácias, possuem a capacidade de degradar a hemoglobina e utilizar o ferro da célula hospedeira, facilitando, desse modo, a invasão de hifas numa candidíase sistêmica (SARDI *et al.*, 2013).

Uma dos principais fatores de virulência envolvido no estabelecimento da infecção por *Candida* é sua versatilidade em colonizar diferentes ambientes e a formação de comunidades microbianas ligadas à superfície, conhecidas como biofilmes. Biofilmes são comunidades de microrganismos devidamente organizados e incorporados em uma matriz extracelular. Este modo de crescimento é um potente fator de virulência para todas as espécies de *Candida* (ARAÚJO *et al.*, 2017).

De acordo com Araújo e colaboradores (2017), a formação de um biofilme ocorre

basicamente em três etapas. Inicialmente ocorre a adesão das células a uma superfície seguida pela divisão celular e formação de uma camada basal de microcolônias, posteriormente a maturação do biofilme. Na última etapa acontece o desprendimento e dispersão das células, onde vão colonizar outros ambientes (Figura 2).

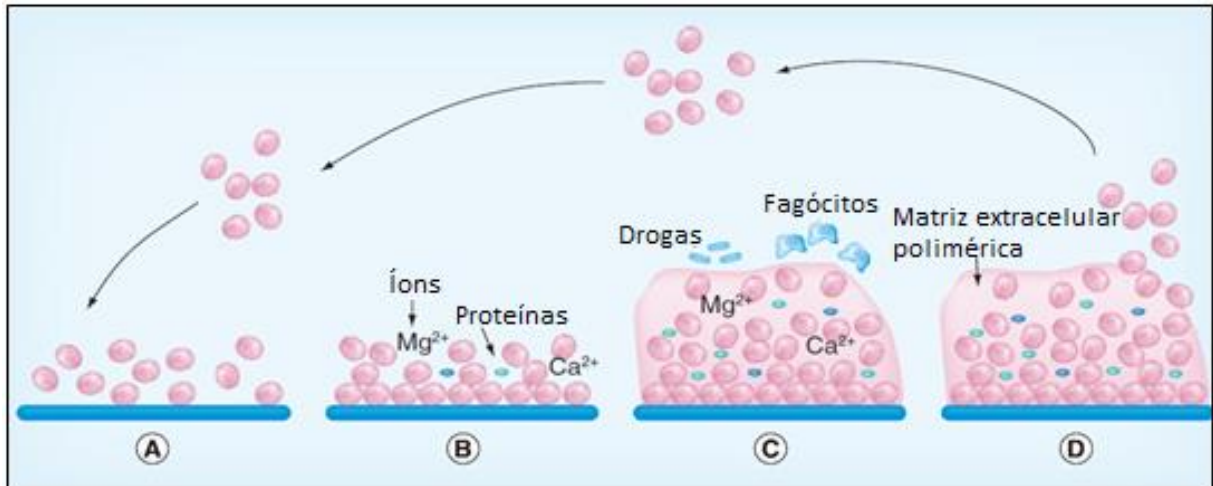


Figura 2 - Fases da formação de biofilme de *Candida*. (A) Aderência inicial. (B) Formação da camada basal de microcolônia. (C) Biofilme maduro e matriz extracelular polimérica. (D) Desprendimento e dispersão. Fonte: Modificado de CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012.

A adesão das leveduras a superfície ocorre através de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as proteínas da parede celular fúngica (do inglês *Cell wall protein* - CWP) e as células hospedeiras ou com material inerte. As principais CWPs envolvidas na adesão são as proteínas com uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), denominadas adesinas e manoproteínas (SILVA *et al.*, 2011; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). A segunda etapa é caracterizada pela proliferação (presença de formas filamentosas) e a produção da matriz extracelular polimérica (EPS) rica principalmente em polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. O EPS confere às células incorporadas, sobretudo, proteção às respostas imunes do hospedeiro e tolerância significativa às terapias antifúngicas (SILVA *et al.*, 2011; CHANDRA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

Durante a formação do biofilme de *Candida*, as células coexistem através do sistema de comunicação intercelular, denominado *Quorum Sensing* (QS), que modula o desenvolvimento e outras atividades de cooperação entre as células. As principais moléculas que atuam como mensageiros nesta comunicação são o tirosol e o farnesol, embora outras moléculas como cis-2-decenoico e outros ácidos graxos de cadeia curta também possam conter sinais de comunicação intercelular. Enquanto o tirosol promove a formação de hifas e biomassa

no estágio inicial do biofilme, o farnesol inibe a formação de hifas, evitando o crescimento excessivo do biofilme e promovendo a dispersão de células (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Por fim, o biofilme maduro iniciar o desprendimento e dispersão de algumas células, vale ressaltar que, esse desprendimento de células favorece a formação de comunidade microbiana em novos locais (SILVA *et al.*, 2011; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2017).

2.3 Mecanismos de resistência

Com o aumento do uso de drogas antifúngicas, o número de relatos de resistência aos medicamentos antifúngicos também aumentou (LIU *et al.*, 2016). A resistência microbiológica envolve mecanismos moleculares, e pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo, e confere a ele a resistência inata, antes da exposição ao antifúngico. Entretanto, a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico, e posteriormente ocorrendo a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes (RAMAGE *et al.*, 2012).

Os principais mecanismos de resistência de *C. albicans* e *C. tropicalis* a compostos azólicos são mutações e sobreexpressões de ERG11p e de bombas de efluxo (CDR1, CDR2 e MFS) (HOLMES *et al.*, 2012; TAFF *et al.*, 2013). As bombas de efluxo são compostas por proteínas, que estão divididas em grupos com base na sua estrutura e tipo de energia que utilizam para o transporte de moléculas. O primeiro grupo inclui transportadores que utilizam a degradação de ATP como fonte de energia, são membros dos grupos CDR1 e CRD2. O segundo grupo consiste de transportadores cuja energia é obtida a partir de gradiente de concentração de prótons presentes em membranas biológicas. Esta categoria é constituída por proteínas MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (WEIL *et al.*, 2017). O aumento da expressão de bombas de efluxo de fármacos na membrana plasmática celular é amplamente reconhecido como a principal causa de resistência clinicamente relevante de *Candida* a azoles (POURAKBARI *et al.*, 2017).

Mutações no gene *ERG11* estão associadas com resistência azólicos, pois afeta a expressão de lanosterol-14 α -demetilase, enzima chave na via da biossíntese de ergosterol e alvo direto de drogas azólicas (TAFF *et al.*, 2013). A superexpressão da UPC2, o fator de transcrição que regula o ERG11 ou eventos de aneuploidia que aumentam o número de cópias ERG11 conduzem a uma maior resistência ao azólicos (WEIL *et al.*, 2017).

A resistência intrínseca durante o crescimento do biofilme é quase universal. Microrganismos que vivem no ambiente de biofilme podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes à ação dos antimicrobianos do que na forma planctônica (LARA *et al.*, 2018). A proteína do choque térmico HSP90, que está envolvida na produção de biofilme também é um regulador da resposta ao estresse. O estresse oxidativo induzido pela ação dos antifúngicos pode ser reparado por respostas adaptativas, contribuindo para a redução da sensibilidade aos antifúngicos (ROBBINS *et al.*, 2011).

2.4 Droga antifúngica

O cetoconazol é um antifúngico que pertence ao grupo dos compostos azólicos, cujo nome químico é cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazolil-metil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1981 como o primeiro de uma série de agentes antifúngicos azólicos disponível no mercado (GREENBLATT *et al.*, 2014; VERMEER *et al.*, 2016).

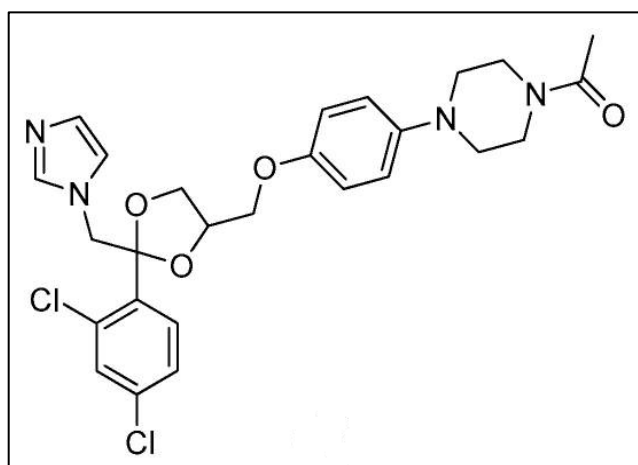


Figura 3 – Estrutura química do Cetoconazol Fonte: modificado de KIM *et al.*, 2017.

O cetoconazol inibe a biossíntese do ergosterol, um componente vital das membranas citoplasmáticas fúngicas, através da inibição da 14 α -desmetilase de lanosterol. A deficiência no ergosterol leva ao aumento da permeabilidade da membrana e interferência no crescimento e na replicação. (YAN *et al.*, 2013; GREENBLATT *et al.*, 2014).

Indicado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose, cromomicose e paracoccidioidomicose (YAN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2017), pode ser encontrado sob a forma de comprimido, creme, pomada e shampoo (FDA, 2013). Em doses elevadas, cetoconazol demonstra toxicidade hepática e alterações nas

glândulas adrenais (FDA, 2013).

A utilização extensiva de agentes antifúngicos para fins terapêuticos ou profiláticos tem gerado problemas não só em relação à toxicidade e a interação medicamentosa negativa com outros agentes prescritos, mas também a respeito da resistência adquirida por microrganismos patogênicos durante um tratamento clínico. Várias abordagens podem ser empreendidas para superar esses problemas, além da descoberta de novos agentes eficazes, uma opção alternativa seria aumentar a atividade dos agentes já existentes através da combinação de agentes antifúngicos com substâncias bioativas (JEŽÍKOVÁ *et al.*, 2017).

2.5 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são um grupo de moléculas heterogêneas, que são divididas em subgrupos com base na sua composição e estrutura de aminoácidos. Os AMPs são moléculas relativamente pequenas, compostos normalmente por 30 a 60 aminoácidos e apresentam uma carga positiva fornecida por resíduos Arg e Lys. São encontrados em diversos organismos, desde insetos a mamíferos (AUVYNET *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012).

São componentes essenciais da defesa do hospedeiro contra infecções e apresentam atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Além de seu papel como antibióticos endógenos, os peptídeos antimicrobianos, também chamados de peptídeos de defesa do hospedeiro, participam de múltiplos aspectos da imunidade (inflamação, reparação de feridas e regulação do sistema imune adaptativo), bem como na manutenção da homeostase (AUVYNET *et al.*, 2009; TRAVKOVA, 2017).

Devido à elevada incidência de microrganismos patogênicos resistentes aos tratamentos convencionais, os PAMs emergiram como uma potente alternativa para aplicações terapêuticas, incluindo o tratamento de amplo espectro de agentes patogênicos, como bactérias, fungos ou vírus, com pouca probabilidade de desenvolver resistência. (CRUSCA *et al.*, 2017).

Essas moléculas exibem a capacidade de interagir com membranas biológicas, promovendo a formação de poros e a lise celular, assim, bactérias e fungos têm dificuldade em superar os efeitos deletérios produzidos pelos AMPs. Além da capacidade de interagir com as membranas, os AMPs podem se ligar a alvos intracelulares importantes e acarretar na inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (LIU *et al.*, 2011).

Embora os PAMs apresentem ótima atividade contra uma variedade de microrganismos. Entretanto, algumas limitações restringem a aplicação terapêutica dessas moléculas, dentre elas, a atividade citolítica contra os eritrócitos humanos. Nessa perspectiva,

formas sintéticas análogas aos peptídeos naturais têm sido expandidas com o objetivo de desenvolver compostos eficientes para o controle microbiológico que sejam, ao mesmo tempo, desprovidos de efeitos citotóxicos contra células humanas (TORCATO *et al.*, 2013).

2.6 Peptídeo antimicrobiano Lys-a1

O peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1 (Lys-a1) é um derivado sintético do peptídeo Hy-A1, inicialmente isolado a partir da secreção da pele do sapo arbóreo *Hypsiboas albopunctatus*, comumente encontrado em regiões da América do Sul e presente na biota do cerrado. Hy-a1 exibe uma potente atividade antimicrobiana, inibindo a proliferação celular de várias cepas bacterianas, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, entretanto, apresenta atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (CASTRO *et al.*, 2009). Então Crusca *et al.* (2011) sintetizaram quatro análogos de Hy-a1, com mudanças na região N-terminal afim de melhorar seus efeitos antimicrobianos e reduzir a atividade citotóxica contra células humanas (CRUSCA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2014)

Dentre os peptídeos sintetizados, destaca-se o peptídeo Lys-a1 (KIFGAIWPLALGALKNLIK) devido a sua estabilidade. Para a obtenção deste, além da substituição da Leu pelo Trp na posição 6, foi adicionada uma lisina (Lys) no N-terminal do peptídeo original (Hy-a1), conferindo uma carga positiva nessa extremidade. Como esperado, o aumento de cargas positivas na extremidade N-terminal do peptídeo melhorou significativamente sua atividade antimicrobiana, sobretudo contra cepas Gram-negativas, em comparação ao peptídeo nativo (CRUSCA *et al.*, 2011). Vale ressaltar, que Silva *et al.* (2012) mostraram a atividade antimicrobiana e antibiofilme da Lys-a1, em baixas concentrações, contra bactérias do gênero *Streptococcus*, se mostrando ser uma ótima opção para antimicrobiana.

A obtenção de AMPs sintéticos tem sido realizada com o intuito de obter peptídeos com as características antimicrobianas dos AMPs originais conservados, porém com as regiões responsáveis pelo efeito citotóxico alterado (LEE *et al.*, 2013). Além disso, peptídeos com alvo específico têm sido utilizados em pesquisas recentes. Tais moléculas ganham regiões de reconhecimento para um determinado microrganismo, possibilitando a atuação do AMP sem alterar a microbiota natural (LI *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade antifúngica do peptídeo Lys-a1 sobre o crescimento planctônico e biofilme de *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida tropicalis* ATCC750.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antifúngica da Lys-a1 durante o crescimento planctônico de *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750 (estabelecimento de CIM e CFM).
- Avaliar a atividade antibiofilme de Lys-a1 em concentrações de MIC sobre o biofilme pré-formado de *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750 durante 72 h.
- Avaliar as células do biofilme pré-formado (24, 48 e 72 h) após do tratamento com Lys-a1 em concentrações de CIM.
- Avaliar o potencial sinérgico entre Lys-a1 e CETO sobre o crescimento planctônico de *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação da solução do peptídeo

O peptídeo foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo Cili da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita. O qual foi sintetizado e purificado segundo metodologia publicada por Crusca e colaboradores (2011).

O peptídeo Lys-[Trp6]hy-a1 (Lys-a1) foi inicialmente dissolvido em água deionizada estéril com 0,1% de ácido acético à concentração estipulada de 4 mg.mL⁻¹, seguido pelo ajuste real da concentração de acordo com o cálculo da concentração, onde a concentração final pode ser convenientemente determinada com base no coeficiente de extinção de resíduos de Tirosina (Y) ou Triptofano (W), como sugerido no site da empresa Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learningcenter/concentration-calculation.html>

No caso de Lys-a1 (KIFGAIWPLALGALKNLIK), o qual não apresenta resíduos de Y, foram utilizados os resíduos de W como base de cálculos. Após determinação da concentração, a solução estoque foi distribuída em alíquotas de 500 µL e posteriormente armazenado em freezer -20 °C. Para utilização nos ensaios biológicos a concentração foi ajustada de acordo com a necessidade experimental.

4.2 Preparação e armazenamento do antifúngico

O antifúngico cetoconazol foi adquirido comercialmente na forma em pó e devidamente diluído em DMSO e estocado em alíquotas de 1 mL, armazenadas a temperatura ambiente, em ausência de luz. Para utilização nos ensaios biológicos a concentração foi ajustada de acordo com a necessidade experimental.

4.3 Cepas microbianas e condições de cultivo

As cepas fungicas utilizada neste estudo foi a *Candida albicans* ATCC90028 (isolada de sangue) e *Candida tropicalis* ATCC750 (isolada de paciente com broncomicose) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil. As cepas encontram-se estocadas em meio de cultura suplementado com 20% de glicerol e armazenadas no freezer a uma temperatura de -80°C.

Para ativação, uma alíquota de 50 µL foi inoculada em 5 mL de meio Sabouraud

Dextrose Broth (SDB) por 24 h a 35 °C. Após as 24h, as culturas foram repicadas inoculando-se uma alíquota de 50 µL em 5 mL de meio SDB caldo estéril, sob manutenção das mesmas condições de crescimento, por 18h. Nesse período as células atingem a fase de crescimento exponencial de acordo com a curva de crescimento previamente estabelecida para cada microrganismo. Para utilização nos ensaios biológicos, uma alíquota da suspensão microbiana terá a concentração ajustada para 2×10^3 UFC.mL⁻¹ por contagem de células em câmara de Neubauer.

4.4 Ensaio de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do peptídeo Lys-a1 e de cetoconazol foram avaliadas através do método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços de fundo U, padronizado segundo o documento M27A2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002).

Realizaram-se diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações com um volume de 100 µL. Em seguida 100 µL de microrganismo 2×10^3 UFC.mL⁻¹ foram adicionados aos poços da placa obtendo um volume final de 200 µL, e concentração final de 1×10^3 UFC.mL⁻¹. Os poços contendo apenas inóculo e meio de cultura SDB foram utilizados como controle de crescimento microbiano.

A placa foi incubada durante 24h a 35°C, para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e da Concentração fungicida mínima (CFM) de cada substância. Foi considerada CIM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano após 24h de incubação. Além disso, a inibição do crescimento planctônico foi visualizada através de leitura espectrofotométrica de DO sob $\lambda = 620$ nm.

Para determinar a CFM, 10 µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Após um período de 24h de incubação a 35°C, foi considerado CFM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície de ágar (Figura 4).

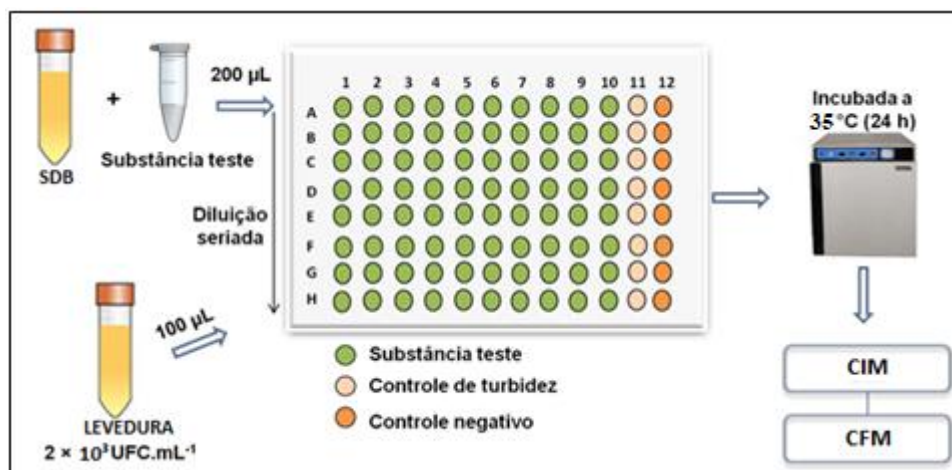


Figura 4 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CFM da Lys-a1 e de CETO contra *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750, segundo o teste de microdiluição padronizado pelo CLSI. Fonte: modificado de OLIVEIRA, 2014.

4.5 Ensaio de susceptibilidade do biofilme pré-formado

Para avaliar o efeito do peptídeo Lys-a1 e do antifúngico CETO sobre o biofilme pré-formado de *C. albicans* e *C. tropicalis* os microrganismos foram cultivados até a fase exponencial, a concentração das células foram ajustadas para 2×10^3 UFC.mL⁻¹ e incubadas em placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato por 24 horas em condições aeróbicas a 35 °C para a formação do biofilme. Após o período de crescimento do biofilme, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remover as células planctônicas. Em seguida os poços contendo o biofilme foram preenchidos com 200 µL das substâncias teste em concentrações de MIC por 60 minutos. Ao controle negativo foram acrescentados apenas meio de cultura SDB caldo estéril. Após o tempo de tratamento ao biofilme, as substâncias foram removidas, os poços lavados duas vezes com PBS 0,1 M estéril com pH 7,4 e em seguida foram acrescentados 200 µL de meio de cultura SDB caldo estéril. A placa foi novamente incubada a 35 °C por 24 horas e, após este tempo, a mesma foi submetida à quantificação da biomassa por CV. Também foi quantificado o metabolismo de células viáveis do biofilme pelo ensaio de XTT.

4.6 Quantificação da biomassa

Para a quantificação da biomassa, as células planctônicas foram removidas e os poços lavados com PBS 0,1 M estéril com pH 7,4. Após secagem da placa a temperatura ambiente, 200 µL de álcool metílico PA foram adicionado e deixado por 15 minutos para

fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 μL CV 0,1% foi adicionado por 10 minutos para permitir uma quantificação indireta da biomassa através da coloração. Em seguida o CV foi removido e repete-se o processo de lavagem e secagem da placa. Em seguida foram adicionados 200 μL de ácido acético 33% por 10 minutos para dissolução do corante preso ao biofilme. A suspensão obtida em cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços onde foi realizada a medição da absorbância em um leitor de microplacas a 590 nm (Figura 5).

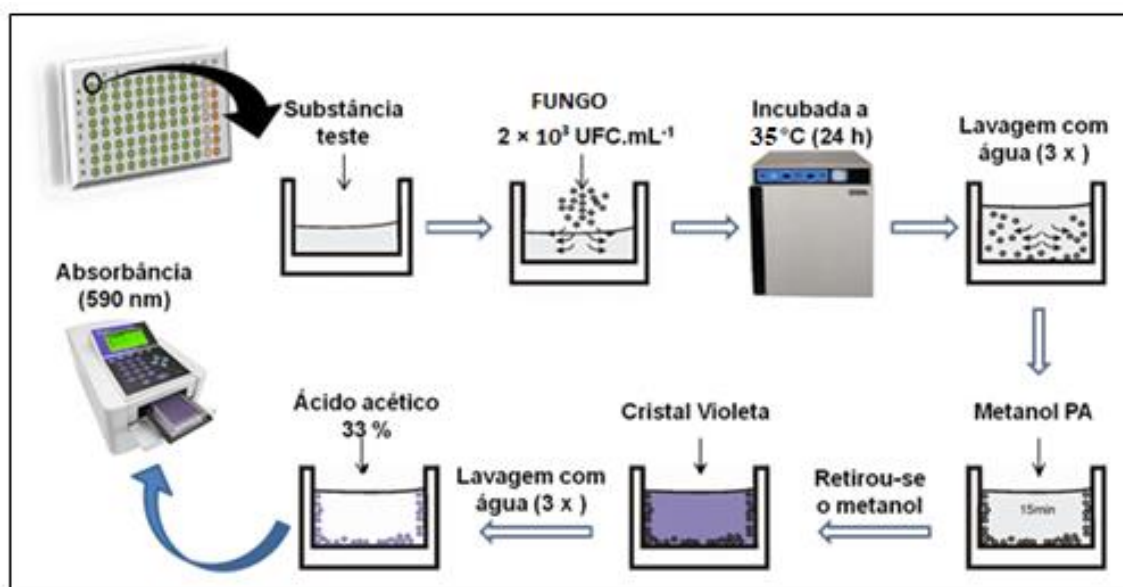


Figura 5 – Representação esquemática da metodologia de quantificação da biomassa do biofilme de *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750 tratado com CETO e combinado com a Lys-a1. Fonte: modificado de OLIVEIRA, 2014.

4.7 Ensaio de avaliação de atividade metabólica das células por XTT

O Ensaio XTT [2,3-bis (2-methoxy-4nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio- 5-carboxanilido] utiliza este sal tetrazolio para avaliar a atividade metabólica de células viáveis do biofilme pós-tratamento. Este ensaio foi realizado utilizando a metodologia de Ragame *et al.* (2001). A solução de PBS/XTT/Menadiona foi dissolvida em uma proporção de 158/40/2 μL por poço utilizado. Após o tratamento os poços foram lavados duas vezes com PBS 0,1 M estéril com pH 7,4 e em seguida preenchidos com 200 μL de solução PBS/XTT/Menadiona e deixado em repouso por 5h a 35°C. Após o tempo transcorrido foi realizada a medição de absorbância em um leitor de microplacas a 492 nm.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As placas foram preenchidas e incubadas como descrito para o ensaio de susceptibilidade do biofilme pré-formado (7.4). Após a incubação as células fracamente aderidas foram removidas por lavagem com PBS 0,1 M estéril com pH 7,4 e as placas foram depois deixadas a secar a temperatura ambiente. Poços contendo biofilmes foram desidratados sequencialmente com concentrações crescentes de etanol (70% durante 10 min, 95% durante 10 min e 100% durante 20 min) e deixado secar à temperatura ambiente. Após a secagem, foram mantidos em dessecador até a análise. Antes da observação, as células foram colocadas em suportes de alumínio e cobertas com partículas de ouro e, em seguida, observadas sob um microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50 – FEI).

4.9 Ensaio de *checkerboard*

A atividade antimicrobiana do antifúngica CETO em combinação com o peptídeo Lys-a1 foi determinada pela técnica de *Checkerboard* (WHITE *et al.*, 1996). Inicialmente as substâncias foram diluídas em meio SDB caldo em diferentes concentrações e combinadas pela adição de 50 µL de cada substância aos poços utilizando placas de poliestireno de 96 poços no sentido vertical (Lys-a1) e horizontal (CETO). Em seguida foi acrescentado 100 µL do microrganismo a 2×10^3 UFC/mL⁻¹, obtendo um volume final de 200 µL em cada poço com concentração microbiana de 1×10^3 UFC/mL⁻¹. Poços que continham apenas inóculo e meio de cultura SDB caldo foram utilizados como controle de crescimento da levedura e poços que continham apenas os tratamentos antimicrobianos foi utilizados como controle de turbidez. A placa foi incubada a 35°C por 24 h em condições aeróbicas para determinação da CIM e da CFM das substâncias combinadas (Figura 6). Para determinação da CIM do antifúngico CETO em combinação com a Lys-a1, foi considerada a menor concentração de CETO em combinação com a Lys-a1 capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano após 24 h de incubação. Além disso, a inibição do crescimento planctônico foi visualizada através de leitura espectrofotométrica na DO de 620 nm. Para determinar a CFM, 10 µL dos poços onde não houver crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura SDA. Foi considerado CFM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície de ágar após 24 horas de incubação a 35 °C em condições aeróbicas.

O Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF) é definido como a soma da

CIM das substâncias, quando utilizadas em combinação, dividida pela soma da CIM das substâncias isoladas. Assim, a interpretação foi categorizada da seguinte forma: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), aditivo ($0,5 < ICIF \leq 1$), indiferente ($1 < ICIF \leq 4$) ou antagonismo ($ICIF > 4,0$) (LEWIS *et al.*, 2002).

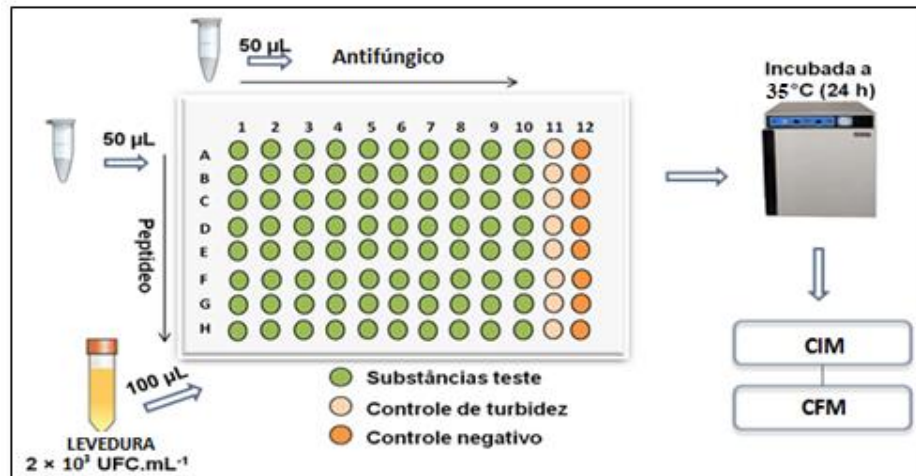


Figura 6 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CFM de CETO combinada com a Lys-a1 contra *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750, segundo a técnica de *Checkerboard*. Fonte: modificado de OLIVEIRA, 2014.

4.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e dados paramétricos foram analisados no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni com $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de CIM e CFM

A atividade antimicrobiana do antifúngico cetoconazol (CETO) e do peptídeo antimicrobiano (Lys-a1) sobre as cepas *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750 foram verificadas segundo o CLSI, 2015. Os resultados mostram que o CETO interfere de forma bastante relevante no crescimento planctônico sobre as duas cepas, apresentando CIM e 1,0 CFM 4,0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ (Tabela 1). A atividade fungicida de CETO foram obtidas somente em concentrações em 4,0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para as duas cepas testadas. Isto demonstra, além da atividade fungicida, o extenso intervalo de concentrações dessa substância com efeito fungistático (CLSI 2002).

O peptídeo Lys-a1 também obteve resultados relevantes, capaz de interferir de forma significativa no crescimento planctônico sobre os microrganismos em questão. Os dados mostraram que Lys-a1 inibiu o crescimento nas concentrações de 31,25 e 3,9 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750, respectivamente (Tabela 1). A CFM para esse AMP foi de 62,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para *C. albicans* e 3,90 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*.

Tabela 1 – CIM e CFM do CETO e da Lys-a1 sobre as cepas *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750.

| Cepa | CETO ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) | | Lys-a1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) | |
|------------------------------|--------------------------------|-----|----------------------------------|------|
| | CIM | CFM | CIM | CFM |
| <i>C. albicans</i> ATCC90028 | 1,0 | 4,0 | 31,25 | 62,5 |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC750 | 1,0 | 4,0 | 3,90 | 3,90 |

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Fungicida Mínima; CETO: Cetoconazol; Lys-a1: Lys-[Trp⁶]hy-a1.

5.2 Susceptibilidade do biofilme pré-formado.

O efeito de CETO e Lys-a1 sobre o biofilme pré-formado de *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750 foram avaliados através da quantificação da biomassa pelo método do Cristal Violeta (CV) e quantificação da taxa metabólica (XTT). As concentrações utilizadas contra *C. albicans* foram de 1,00 e 31,25 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para CETO e peptídeo Lys-a1, respectivamente. Em relação a *C. tropicalis* as concentrações estabelecidas foram de 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para CETO, e 3,9 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para lys-a1. Ambos foram testados sobre o biofilme pré-formado.

Na primeira análise, após 24 horas de formação de biofilme de *C. albicans*, o agente antifúngico e o peptídeo antimicrobiano não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (**Figura 7 A**). No segundo tratamento, 48 h, os grupos tratados apresentaram-se diferentes em relação ao grupo não tratado, apresentando uma menor quantidade de biomassa formada. Entretanto, no terceiro tratamento, 72 h, percebeu-se um aumento expressivo na produção da biomassa do grupo Lys-a1, comparável aos valores apresentados pelo grupo controle. Já para o grupo tratado com CETO a biomassa de 72 h manteve-se em valores similares as duas análises anteriores.

Em relação à taxa metabólica, por redução de XTT, do biofilme de *C. albicans* (Figura 7 B), o primeiro tratamento, após 24 h, não mostrou diferenças significativas entre os grupos testados. Após 48 h, o grupo Lys-a1 apresentou um aumento no metabolismo celular enquanto que o grupo CETO teve uma redução em relação ao grupo não tratado. Após 72 h de formação de biofilme, observou-se que o grupo Lys-a1 teve taxa metabólica semelhante ao grupo controle, no entanto o grupo CETO não mostrou alteração.

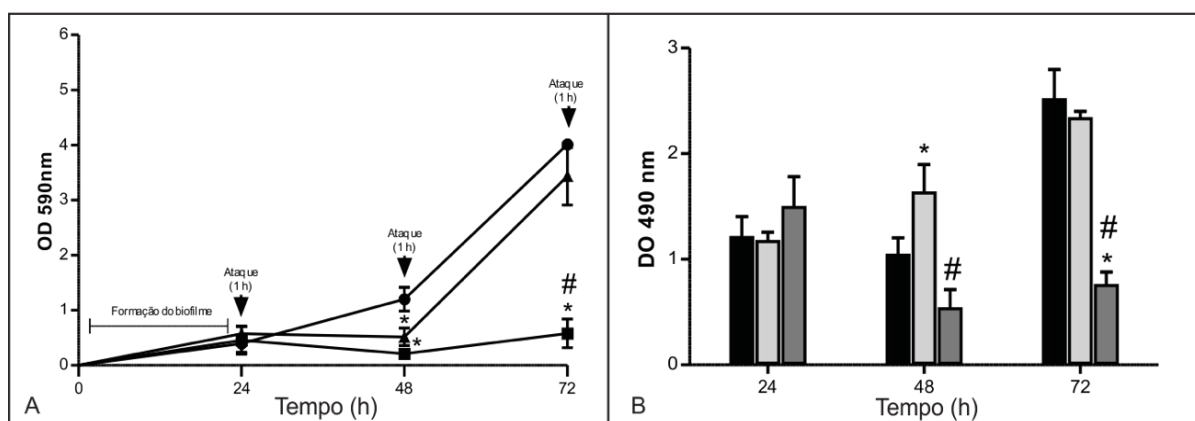


Figura 7 – Quantificação de biomassa por cristal violeta (A) e taxa metabólica por redução de XTT (B) da formação de biofilme de *C. albicans* ATCC90028 durante 24, 48 e 72 horas. Imediatamente antes da análise, cada grupo foi tratado com o agente antimicrobiano por uma 1 hora. ●/preto – controle; ▲/cinza claro – Lys-a1; ■/cinza escuro – Cetoconazol). *($p > 0,01$) estatisticamente diferente em relação ao controle e # ($p < 0,01$) estatisticamente diferente em relação a Lys-a1.

Para o biofilme de *C. tropicalis*, após o primeiro tratamento, 24 h, não resultou em diferenças significativas na biomassa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 8 A). A partir do segundo tratamento a biomassa do grupo tratado com Lys-a1 tem crescimento similar ao do grupo controle, enquanto o grupo tratado com CETO permanece com biomassa de quantificação constante.

Os dados obtidos para a taxa metabólica do biofilme pré-formado de *C. tropicalis* ATCC750 (Figura 8 B), 24 h, mostram que os grupos tratados não tiveram diferenças significativas em relação ao controle. Entretanto, a partir de 48 e 72 h, observa-se um aumento expressivo na taxa metabólica do grupo tratado com Lys-1 em relação ao grupo CETO e controle.

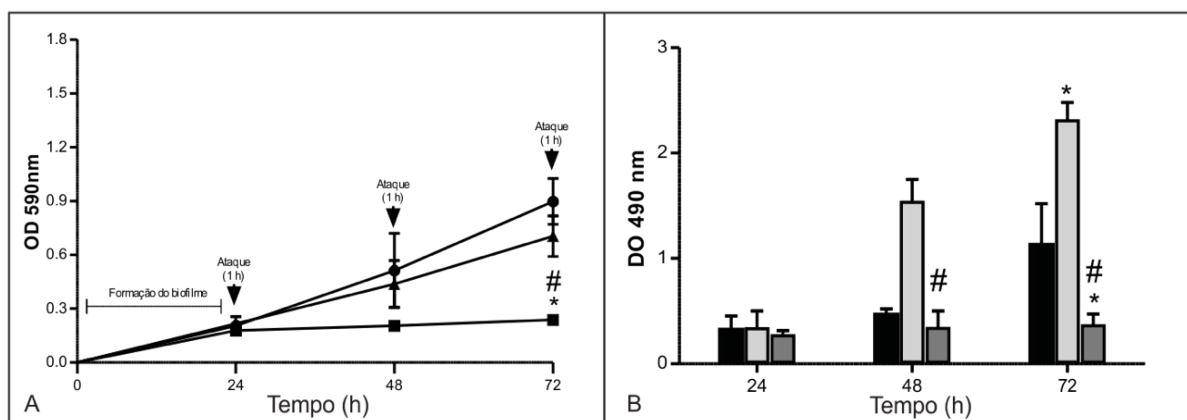


Figura 8 – Quantificação de biomassa por cristal violeta (A) e taxa metabólica por redução de XTT (B) da formação de biofilme de *C. tropicalis* ATCC750 durante 24, 48 e 72 horas. Imediatamente antes da análise, cada grupo foi tratado com o agente antimicrobiano por uma 1 hora. ●/preto – controle; ▲/cinza claro – Lys-a1; ■/cinza escuro – Cetoconazol. * ($p > 0,01$) estatisticamente diferente em relação ao controle e # ($p < 0,01$) estatisticamente diferente em relação à Lys-a1.

Quando se analisa as imagens de microscopia de varredura, percebe-se que o tratamento do biofilme de 24 h de *C. albicans* e *C. tropicalis* com os antifúngicos em questão causam uma modificação da estrutura das células aderidas à superfície (Figura 9). Para as duas leveduras abordadas no estudo, assim como cetoconazol, o PAM Lys-1 possui um efeito citolítico, representado por setas pretas, sobre as hifas das duas espécies consideradas nesse estudo (figura 9B e 9E). Entretanto, para além desse efeito, *C. tropicalis* apresenta uma aparente produção de polissacarídeos (EPS) tanto no grupo de cetoconazol quanto no grupo de Lys-1, com destaque para este último. Isso pode estar relacionado aos mecanismos de defesa desses microrganismos.

Apesar do efeito fungicida apresentado para os dois agentes antimicrobianos sobre as leveduras em questão, claramente pode-se perceber a presença de células viáveis, representadas pelas setas verdes, assim como no grupo controle, em todos os tratamentos analisados (Figura 9). Nesse contexto, o grupo com o agente comercial, cetoconazol, destaca-se pela presença de uma grande quantidade de células viáveis, assim como no controle,

reafirmando seu efeito fungistático.

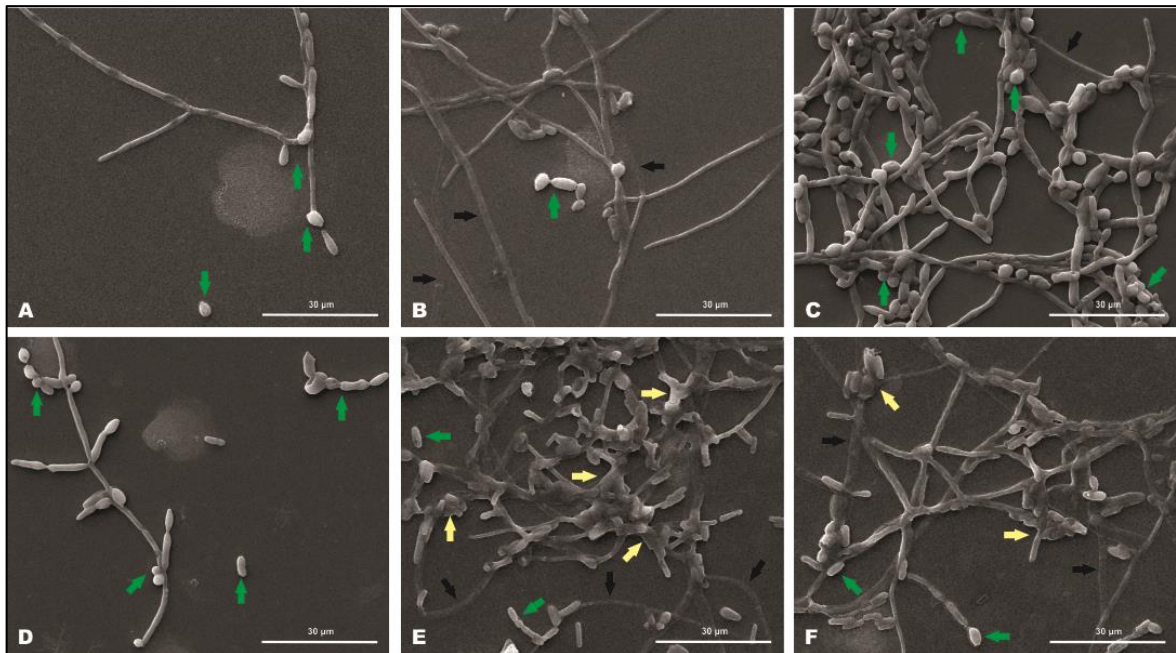


Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme de 24 horas de *Candida albicans* ATCC 90028 e *C. tropicalis* ATCC 750 após o tratamento antimicrobiano, lys-a1 e CETO, por 1 hora, e incubado por mais 24 h. *C. albicans* não tratado (A); *C. albicans* tratado com lys-a1 (B); *C. albicans* tratado com CETO (C); *C. tropicalis* não tratado (D); *C. tropicalis* tratado com lys-a1 (E); *C. tropicalis* tratado com CETO (F). Células viáveis (seta verde), hifas em lise (setas pretas), aparente produção de exopolissacarídeo (setas amarelas).

5.3 Determinação do ICIF

Para avaliar a influência do peptídeo Lys-a1 na atividade antimicrobiana do antifúngico cetoconazol, foi determinada pela técnica de *Checkerboard*, através da qual foi obtido o Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF). A tabela 2 apresenta as concentrações subinibitórias do CETO e da Lys-a1 em diferentes combinações nas quais foram observadas a inibição do crescimento planctônico de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. tropicalis* ATCC 750. Além disso, é apresentado o ICIF obtido de cada combinação e a interpretação da interação estabelecida. O resultado da associação entre as duas substâncias mostrou predominantemente interações aditivas e sinérgicas para maioria das combinações. Sendo assim, houve uma considerável redução da CIM de CETO, acima de 300 vezes para as cepas *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC725, onde apresentou atividade antimicrobiana a $0,003 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Para Lys-a1, quando combinada com cetoconazol, proporcionou reduções da CIM em 8 vezes para os dois microrganismos testados.

Tabela 2 – Valores e interpretação do ICIF de Cetoconazol combinado com a Lys-a1 contra *C. albicans* ATCC90028 e *C. tropicalis* ATCC750. Fonte: Próprio autor. CETO: Cetoconazol Lys-a1: Lys-[Trp⁶]hy-a1; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracional.

| Microrganismos | SUBSTÂNCIAS | | CIF | Interpretação |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------|---------------|
| | CETO ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) | Lys-a1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) | | |
| <i>Candida albicans</i> ATCC90028 | 0,007 | 15,62 | 0,506 | Aditivo |
| | | 7,81 | 0,256 | Sinérgico |
| | 0,003 | 15,62 | 0,499 | Sinérgico |
| | | 7,81 | 0,252 | Sinérgico |
| | | 3,90 | 0,127 | Sinérgico |
| | <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 | 0,007 | 1,95 | 0,507 |
| 0,97 | | | 0,255 | Sinérgico |
| 0,003 | | 1,95 | 0,503 | Aditivo |
| | | 0,97 | 0,251 | Sinérgico |
| | | 0,48 | 0,126 | Sinérgico |

6 DISCUSSÃO

A resistência antifúngica é um problema emergente em todo o mundo, e isso dificulta ainda mais a seleção da terapia apropriada (SILVA *et al.*, 2012). O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos na terapia e no tratamento prolongado geralmente leva ao desenvolvimento de resistência (BONDARYK *et al.*, 2017). Nessa perspectiva a utilização de substâncias naturais e sintéticas vem ganhando cada vez mais espaço, dentre os quais estão os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (DELATTIN *et al.*, 2017). Essas moléculas, produzidas naturalmente por diferentes espécies, fazem parte da imunidade de muitos desses organismos (ZASLOFF, 2002). Por isso, são constantemente relatados como importantes agentes antimicrobianos naturais devido sua atividade contra patógenos bacterianos, virais e fúngicos (SWIDERGALL E ERNST, 2014). Além de atuarem isoladamente, os PAMs têm sido estudados em combinação com outras substâncias, tais como, Anfotericina B e Fluconazol, apresentando resultados promissores com grande potencial em termos de atividade antimicrobiana (SENGUPTA *et al.*, 2012).

Os resultados mostram que CETO interfere de forma bastante relevante no crescimento planctônico das duas cepas, com CIM de $1,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido em estudo realizado por Sharifynia e colaboradores (2017) onde testaram a sensibilidade de cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente a CETO, com MIC 14 e $1 \mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. A CFM obtida foi de $4,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para os dois microrganismos testados, este resultado se deve a natureza fungistática dos azóis, na qual altas concentrações da droga são necessárias para atingir o efeito fungicida (MORA-NAVARRO *et al.*, 2015).

No que se refere à atividade antimicrobiana do peptídeo Lys-a1 notou-se uma maior susceptibilidade das cepas de *C. tropicalis* quando comparada a *C. albicans*. As CIMs obtidas foram diferentes para as duas cepas, com concentrações de 31,25 e $3,90 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente (Figura 1). Em relação ao CFM, as concentrações capazes de erradicar as duas cepas também se diferenciam, para *C. albicans* foi $62,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e para *C. tropicalis* $3,9 \mu\text{g/mL}^{-1}$, observou-se que a última cepa demonstrou maior sensibilidade ao peptídeo antimicrobiano (Tabela 2).

Este resultado pode ser atribuído às diferenças estruturais da parede celular das células *C. albicans* e *C. tropicalis* e o fato do principal mecanismo de ação dos PAMs ser a interação com membrana celular, levando a sua desestabilização. Visto que o arranjo dessas cadeias difere entre as espécies do mesmo gênero, ou seja, o grau de porosidade dessas paredes

é diferente para cada espécie e podem interferir significativamente na passagem do peptídeo para alcançar a membrana (De SOUSA MOREIRA, 2010). Portanto, sugere-se que a parede celular das leveduras testadas pode interferir na passagem do peptídeo para alcançar a bicamada de fosfolipídios. Pois a concentração antimicrobiana de Lys-a1 necessárias para um efeito antimicrobiano sobre *C. albicans* foi 16 vezes superior à utilizada sobre as células de *C. tropicalis*.

O antifúngico Cetoconazol é frequentemente utilizado na clínica e foi o primeiro composto azólico a ser administrado via oral para tratar infecções fúngicas sistêmicas (VERMEER *et al*, 2016). No entanto apesar de sua eficácia contra vários tipos de microorganismos, o uso generalizado do cetoconazol nos tratamentos profiláticos e empíricos, vêm comprometendo sua atividade biológica, no que se refere, o aparecimento de novas cepas resistentes ao medicamento (SHARIFYNIA *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017).

Sabe-se que as espécies de *Candida* são patógenos capazes de causar desde infecções localizadas na mucosa até o desenvolvimento de quadros clínicos mais graves, como as candidemias no hospedeiro. Esses microrganismos são capazes de persistir dentro do hospedeiro devido os fatores de patogenicidade e resistência a variados tipos de fármacos, constantemente levando ao fracasso as estratégias terapêuticas (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). Um dos fatores mais comuns que implicam na resistência às drogas é a capacidade que esses microrganismos têm de formar biofilmes. Uma vez formado, as células inseridas dentro do biofilme tornam-se resistentes as defesas do sistema imune do hospedeiro e aos antimicrobianos do que as células planctônicas (BRILHANTE *et al.*, 2017).

Nesse trabalho, as concentrações do peptídeo Lys-a1, e do antifúngico CETO, que foram capazes de interferir no crescimento planctônico de *C. albicans* e *C. tropicalis* não foram efetivas contra o biofilme pré-formado de 24h, ou seja, não foram capazes de reduzir a biomassa e tampouco interferir na viabilidade celular. Este fato pode ser atribuído principalmente, aos mecanismos de resistência da comunidade, que estão diretamente relacionados às características de sobrevivência das células microbianas neste sistema. Dentre estas características, destacam-se o aumento da densidade celular, as alterações na expressão gênica, a diminuição da taxa de crescimento celular em decorrência da limitação de nutrientes e a indução dos sistemas de bombas de efluxo (RAMAGE *et al.*, 2012; DE MELLO *et al.*, 2017). Nestas condições acontecem mudanças no metabolismo das células mais profundas do biofilme, gerando heterogeneidade da população e a presença de células persistentes, ou seja, células menos suscetíveis à ação dos antimicrobianos (DESAI *et al.*, 2014). Além dos fatores citados, soma-se ainda, a presença da matriz extracelular, que dificulta a difusão dos

antimicrobianos (MATHÉ E VAN DIJCK, 2013). Este fato pode ser observado na figura 9 E, que apresentou uma intensa matriz extracelular sobre as células fúngicas de *C. tropicalis* tratadas com Lys-a1. Um mecanismo peculiar em espécies de *Candida* é a produção de β -(1,3)-glucana, um componente da matriz extracelular, que sequestra moléculas antifúngicas, especialmente os azólicos e polienos, impedindo que tais moléculas possam atingir o seu respectivo alvo intracelular (TAFF *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Em estudo realizado por Mora-Navarro e colaboradores (2015) observou-se que a CIM de CETO na forma planctônica, de *C. albicans*, não foi eficiente quando utilizado em biofilme, mesmo aumentando as dosagens do antifúngico, apenas 60% foi erradicado, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Este fato se deve porque as células sésseis dentro de biofilmes são menos suscetíveis a agentes antifúngicos do que células planctônicas, já que o desenvolvimento de resistência a drogas tem sido associado, por exemplo, a um aumento no processo de maturação do biofilme (SILVA *et al.*, 2017). Estudos mostraram que os microrganismos em biofilmes podem possuir resistência a antimicrobianos até 1000 vezes superior à concentração utilizada para o crescimento planctônico (LARA *et al.*, 2018).

Troskie e colaboradores (2014) demonstraram que os peptídeos tirocidinas TrcA, B e C possuem atividade contra células planctônicas e também são capazes de prevenir a formação de biofilme. Porém as tirocidinas e análogos não foram tão eficazes em erradicar completamente os biofilmes maduros, sendo necessário elevar 26 vezes as concentrações para reduzir apenas 50% da atividade metabólica do biofilme pré-formado de *C. albicans* em comparação às utilizadas no crescimento planctônico.

O aumento no metabolismo celular pode ser associado a possíveis alterações de características microbianas. Essas alterações podem estar relacionadas com a influência da expressão gênica, o que reflete em temas de metabolismo microbiano. No biofilme, as células já possuem uma expressão gênica diferenciada da sua respectiva forma planctônica, e que se dá principalmente por transferência horizontal de material genético entre as células da biomassa (TAFF *et al.*, 2013). O surgimento de células especializadas, com maior capacidade de resistência aos agentes microbianos, de maneira geral, está correlacionado ao ambiente onde as mesmas estão inseridas. As variações na mudança de gradiente de nutrientes, assim como elétrons e oxigênio, acabam por criar um microambiente favorável para que haja uma resposta celular com reflexos na expressão gênica (RAMAGE *et al.*, 2012).

Intensivas pesquisas são realizadas sobre a combinação de agentes antifúngicos como uma nova estratégia terapêutica para combater biofilmes fúngicos (DE CREMER *et al.*, 2015). A utilização de tais combinações em comparação com compostos únicos tem várias

vantagens. Dentre elas, a baixa resistência podendo resultar em um espectro de atividade mais amplo (DELATTIN *et al.*, 2016). Por fim, podem surgir interações sinérgicas que permitem diminuir as dosagens eficazes dos compostos antifúngicos, levando a uma redução tanto dos efeitos colaterais tóxicos quanto dos custos econômicos.

Diminuir a quantidade efetiva de agente necessário para o tratamento de infecções fúngicas, torna-se uma perspectiva atraente no desenvolvimento de novas alternativas antifúngicas (BINK *et al.*, 2011). No presente estudo foi evidenciado efeitos sinérgicos das combinações de CETO e Lys-a1 (Tabela 2), em concentrações abaixo dos níveis individuais de MIC contra *C. albicans* e *C. tropicalis* na forma planctônica.

Mora-Navarro e colaboradores (2015) avaliaram o sinergismo entre β -peptídeo com Cetoconazol sobre *C. albicans*. A combinação potencializou o efeito antimicrobiano em concentrações subinibitórias, reduzindo em 10 vezes a concentração da CIM de CETO. Resultados estes, foram inferiores ao encontrado neste estudo, pois a combinação de Lys/CETO reduziu em mais de 300 vezes a concentração do antifúngico.

Sugere-se que o sinergismo pode estar relacionado à combinação de diferentes mecanismos de ação dos agentes, onde lys-a1 promove a desestabilização da membrana formando poros e cetoconazol inibindo a biossíntese do ergosterol aumentando a permeabilidade da membrana, somando isso, acarretando na lise celular.

Kobayashi e colaboradores (2011) demonstraram que a combinação de lactoferrina, um peptídeo encontrado em fluidos biológicos e grânulos de neutrófilos, com fluconazol aumenta sinergicamente a atividade antifúngica do fluconazol contra *Candida* spp. e inibir a formação de hifas em cepas resistentes ao fluconazol de *Candida albicans*.

O sinergismo de Lys-a1 com outra classe de antimicrobiano, como o antibiótico ciprofloxacina (CIP), avaliado por Oliveira (2014), que a combinação obteve redução de 16 vezes da CIM da CIP contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, evidenciando o efeito do peptídeo em potencializar a atividade antimicrobiana de diferentes fármacos.

O desenvolvimento de novos tratamentos clínicos e método terapêutico contra infecções ocasionado por *Candida* dependerá da compreensão dos mecanismos de resistência e métodos para superá-las pela aplicação de combinações de drogas adequadas com efeitos sinérgicos.

7 CONCLUSÃO

O peptídeo Lys-a1 favoreceu a atividade antimicrobiana de Cetoconazol sobre as cepas testadas na forma planctônica, reduzindo as concentrações do antifúngico. Assim os nossos resultados fornecem informações sobre a capacidade do peptídeo Lys-a1 e oferece um ponto de partida para pesquisar tratamentos combinados contra biofilme de *Candida*. No geral, os resultados apresentados neste estudo apoiam a hipótese de desenvolver tratamentos de combinação de fármacos, baseados em peptídeos antimicrobianos como Lys-a1, para o tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por biofilme.

REFERENCIAS

- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends Microbiol.** v. 25, n. 1, p. 62-75, jan 2017.
- AUVYNET, C.; ROSENSTEIN, Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **FEBS J.** v. 276, n. 22, p. 6497-508, nov, 2009.
- BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. J. S.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Medical mycology**, v. 1, p. 1, 2017.
- BINK, A.; PELLENS, K.; CAMMUE, B.P.A; THEVISSSEN, K. Anti-Biofilm Strategies: How to Eradicate Candida Biofilms?. **The Open Mycology Journal**, v.5, p. 29-38, 2011.
- BONDARYK, M.; STANISZEWSKA, M.; ZIELIŃSKA, P.; URBAŃCZYK-LIPKOWSKA, Z. Natural Antimicrobial Peptides as Inspiration for Design of a New Generation Antifungal Compounds. **J Fungi (Basel)**. v. 3, n. 3, p. 46, set. 2017.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA Jr, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, feb. 2009.
- CAVALHEIRO, M. E.; TEIXEIRA, M. C. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front Med (Lausanne)**. v. 5, p. 28, 2018.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr.** v. 3, n. 4, agost. 2015.
- CHAFFIN, W.L. Candida albicans Cell Wall Proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.72, n. 3, p. 495-544, set. 2008.
- CHAFFIN, W. L.; RIBOT, L. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiol Mol Biol Rev.** n. 62, v. 1, p. 130–180, mar. 1998.
- CHEN, L.; WEN, Y. M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International journal of oral science**, v. 3, n. 2, p. 66-73, abr. 2011.

CLEVELAND, A; FARLEY, M; HARRISON, L; STEIN, B; HOLLICK, R; LOCKHART, S; MAGILL, S; DERADO, G; PARK, B; CHILLER, T. Changes in Incidence and Antifungal Drug Resistance in Candidemia: Results From Population-Based Laboratory Surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. **Clin Infect Dis.** v. 55, n. 10, p. 1352–1361, nov. 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). References methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27-A2, 2nd ed., **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2002.

CRUSCA, E. J.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-Terminus modifications on the 44 biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

CRUSCA, E. J.; CÂMARA, A.; MATO, C.; MARCHETTO, R.; CILLI, E.; LIÃO, L.; LIMA, A. NMR structures and molecular dynamics simulation of hylin-a1 peptide analogs interacting with micelles. **J Pept Sci.** v. 23, n. 6, p. 421-430, jun. 2017.

CUÉLLAR-CRUZ, M; LÓPEZ-ROMERO, E; VILLAGÓMEZ-CASTRO, JC; RUIZ-BACA, E. Candida species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol.** v. 7, n. 6, p. 755-771, 2012.

DA COSTA, J.P.; COVA, M.; FERREIRA, R.; VITORINO R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 99, n. 5, p. 2023-40, mar. 2015.

DA SILVA, B. R.; FREITAS, V. A. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; AGUIAR, A. S. W.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. **Peptides.**, v. 36, n. 2, p. 315-321, ago. 2012.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DE MELLO, T. P.; RAMOS, L. S.; BRAGA-SILVA, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; DOS SANTOS, A. L. S. Fungal Biofilm – A Real Obstacle Against an Efficient Therapy: Lessons from Candida. **Current topics in medicinal chemistry.** v. 17, p. 1-18, 2017.

DE CREMER, K.; STAES, I.; DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; DE BRUCKER, K. New insights into the pathogenesis and treatment of Candida albicans biofilms: 2015, submitted to expert review of anti-infective therapy. **Submitted to expert review of anti-infective therapy**, 2015.

DELATTIN, N.; DE BRUCKER, K.; CRAIK, D. J.; CHENEVAL, O.; FROHLICH, M.;

VEBER, M.; GIRANDON, L.; DAVIS, T. R.; WEEKS, A. E.; KUMAMOTO, C. A.; COS, P.; COENYE, T.; DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K., Plant-derived decapeptide OSIP108 interferes with *Candida albicans* biofilm formation without affecting cell viability. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 58, v. 5, p. 2647-2656, 2015.

DELANTTIN, N.; BRUCKER, K.; CREMER, K.; CAMMUE, B. P., THEVISSSEN, K. Antimicrobial Peptides as a Strategy to Combat Fungal Biofilms. **Curr Top Med Chem**. v. 17, p. 604-612, 2017.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D.R. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harb Perspect Med**. n.4, v. 10, out. 2014.

DE SOUSA MOREIRA, T. M. Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (MYRTACEAE). **Tese de Doutorado**. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, 2010.

DOI, A.; PIGNATARI, A.; EDMOND, M.; MARRA, A.; CAMARGO, L.; SIQUEIRA, R.; MOTA, V.; COLOMBO, A. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, jan. 2016.

DOS SANTOS A. L. S; DE MELLO T. P.; DE SOUZA R. L.; BRANQUINHA, MH. Biofilm: A Robust and Efficient Barrier to Antifungal Chemotherapy. **J Antimicro**, v. 1, p. 101. 2015

DOUGLAS, L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**. v. 11, n. 1, p. 30-36, jan. 2003.

FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems. UCM 362444: 26, jul. 2013.

FRIDKIN, J.; JARVIS, W. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. **Clinical Microbiology reviews**. v. 9, n. 4, p. 499-511. out. 1996.

GREENBLAT, H.; GREENBLAT, D. Liver injury associated with ketoconazole: review of the published evidence. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 54, n. 12, 2014.

HØIBY, Niels. “A short history of microbial biofilms and biofilm infections.” **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. v. 125, p. 272-275, 2017.

HOLMES, A.; KENIYA, M.; IVNITSKI-STEELE, K.; MONK, B.; LAMPING, E.;

SKLAR, L.; CANNON, R. The Monoamine Oxidase A Inhibitor Clorgyline Is a Broad-Spectrum Inhibitor of Fungal ABC and MFS Transporter Efflux Pump Activities Which Reverses the Azole Resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 56, n. 3. p. 1508-1515, mar. 2012.

JEŽÍKOVÁ, Z.; PAGÁČ, T.; PFEIFEROVÁ, B.; BUJDÁKOVÁ, H.; DIŽOVÁ, S.; JANČÍKOVÁ, I.; GÁŠKOVÁ, D.; OLEJNÍKOVÁ, P. Synergy between azoles and 1,4-dihydropyridine derivative as an option to control fungal infections. **Antonie Van Leeuwenhoek.** jun. 2017.

KIM, J.; CHOI, W.; LEE, S.; LEE, H. Revisiting the Metabolism and Bioactivation of Ketoconazole in Human and Mouse Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolomics. **Int J Mol Sci.** v. 18, n. 13, mar. 2017.

KOBAYASHI, T.; KAKEYA, H.; MIYAZAKI, T.; IZUMIKAWA, K.; YANAGIHARA, K.; OHNO, H.; YAMAMOTO, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. **Jpn J Infect Dis.** v. 64, n. 4, p. 292-6, 2011.

LARA, H. H.; GUIBBIERS, G.; MENDOZA, J.; MIMUN, L. C.; VINCENT, B. A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; NASH, K. L. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. **Int J Nanomedicine.** n. 3, v. 13, p. 2697-2708, maio 2018.

LEE, J. K.; PARK, S. C.; HAHM, K. S.; PARK, Y. Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: Placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1828, n. 2, p. 443-454, fev. 2013.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 49, n.2, p. 345-351, fev. 2002.

LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **J Microbiol,** v.55, n. 10, p. 753-766, out. 2017.

LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors,** v. 12, n. 3, p. 2519-2538, jan. 2012.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides,** v. 37, n. 2, p. 207-215, out. 2012.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHOU, X.; HU, S.; ZHANG, S.; WU, H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm.

International Journal of Antimicrobial Agents, v. 37, n. 1, p. 33-38, jan. 2011.

LIU, X; WANG, D; YU, C; LI, T; LIU, J; SUN, S. Potential Antifungal Targets against a *Candida* Biofilm Based on an Enzyme in the Arachidonic Acid Cascade—A Review. **Front Microbiol**, v. 7, p. 19-25, 2016.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005.

MATHÉ, L. E.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Curr Genet**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.

MORA-NAVARRO, C.; CARABALLO-LEÓN, J.; TORRES-LUGO, M.; ORTIZ-BERMÚDEZ, P. Synthetic antimicrobial β -peptide in dual-treatment with fluconazole or ketoconazole enhances the in vitro inhibition of planktonic and biofilm *Candida albicans*. **J Pept Sci**, v. 12, n. 21, p.853-861, 2015.

OLIVEIRA, S T. Uso do peptídeo sintético Lys-a1 no favorecimento da atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. 2014. 89 páginas. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**. Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE. 2014.

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; KARAMITALAB, M.; JAFARI, M.; TARAZ, H.; EBRAHIMI, H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, p. 113-118, 2013.

POLKE, M; LEONHARDT, I; KURZAIB, O; JACOBSEN, I. Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. **Crit Rev Microbiol**, v. 13, p. 1-14, jun. 2017.

POURAKBARI, B.; TEYMURI, M.; MAHMOUDI, S.; VALIAN, S. K.; MOVAHEDI, Z.; ESHAGHI, H.; MAMISHI, S. Expression of Major Efflux Pumps in Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. **Infect Disord Drug Targets**, v. 3, n. 17, p. 178-184, 2017.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R., SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, fev. 2012.

RIVERA, L.; RAMOS, A.; DESGARENNES, C. Factores de virulencia en *Candida* sp. **Dermatología Rev Mex**, v. 49, n. 1, p. 12-27, 2005.

ROBBINS, N.; UPPULURI, P.; NETT, J.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; ANDES, D.; COWEN, L. E. Hsp90 Governs Dispersion and Drug Resistance of Fungal Biofilms. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, set. 2011.

SANTOS, A.L.S. D.; Galdino, A.C.M.; Mello, T.P.; Ramos, L.S.; Branquinha, M.H.; Bolognese, A.M.; Columbano Neto, J.; Roudbary, M. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 113, p. e180212, 2018.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. E GIANNINI, M. J. S. M., Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SENGUPTA, J.; SAHA, S.; KHETAN, A.; SARKAR, S. K.; MANDAL, S. M., Effects of lactoferricin B against keratitis-associated fungal biofilms. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 5, p. 698-703, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUE, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEVEDO, J. Adherence and biofilm formation os non-Candida albicans Candida species. **Trends in Microbiology**. v. 19, n. 5. May 2011.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**. v. 36, p. 288-305. 2012.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. **J. Fungi**,v. 1, n. 3, 2017.

SHARIFYNIA, S.; FALAHATI, M.; AKHLAGHI, L.; FOROUMADI, A.; FATEH, R. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of Candida species isolated from patients with vulvovaginitis in Tehran, Iran. **J Res Med Sci**. v. 22, n. 26, dez. 2017.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. Aspartic proteinases of Candida spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, p. 1-11, 2013.

SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. Characterization of fungal biofilm-based catheter-related sepsis. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, p. 48–52, 2012.

STROLLO, S; LIONAKIS, M; ADJEMIAN, J; STEINER, C; PREVOTS, R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002–2012. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 1, p. 7–13, 2017.

SUDBERY, P. Growth of Candida albicans hyphae. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 737-748, ago. 2011.

- SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future microbiology*, v. 8, n. 7, p. 877-886, jul. 2013.
- SWIDERGALL, M. E ERNST, J. F. Interplay between *Candida albicans* and the Antimicrobial Peptide Armory. ***Eukaryot Cell***, v. 13, n. 8, p. 950–957, ago. 2014.
- TAFF, H.; MITCHELL, K.; EDWARD, J.; ANDES, A. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. ***Future Microbiol***, v. 8, n. 10, out. 2013.
- TOTH, R.; TOTH, A.; VAGVÖLGYI, C.; GACSER, A. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. ***Current Protein and Peptide Science***, v. 18, p. 1-7, 2017.
- TOMIČIĆ, R.; TOMIČIĆ, Z.; RASPOR, P. Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to Wooden Surfaces. ***Food Technol Biotechnol***. v. 55, n. 1, p. 138-14, mar. 2017.
- TORCATO, I. M.; HUANG, Y. H.; FRANQUELIM, H. G.; GASPAR, D.; CRAIK, D. J.; CASTANHO, M. A. R. B.; TROEIRA HENRIQUES, S. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes***, v. 1828, n. 3, p. 944-955, mar. 2013.
- TRAVKOVA, O.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. ***Adv Colloid Interface Sci***, jun. 2017.
- TROSKIE, A. M.; RAUTENBACH, M.; DELATTIN, N.; VOSLOO, J. A.; DATHE, M.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Synergistic activity of the tyrocidines, antimicrobial cyclodecapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*, with amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. ***Antimicrob Agents Chemother***, v. 58, p. 3697-707, jul. 2014.
- VERMEER, L.; ISRINGHAUSEN, C.; OGILVIE, B.; BUCKLEY, D. Evaluation of Ketoconazole and Its Alternative Clinical CYP3A4/5 Inhibitors as Inhibitors of Drug Transporters: The In Vitro Effects of Ketoconazole, Ritonavir, Clarithromycin, and Itraconazole on 13 Clinically-Relevant Drug Transporters. ***Drug Metabolism and Disposition***. v. 33, n. 3, p. 453-459, mar. 2016.
- WEIL, T.; SANTAMARÍA, R.; LEE, W.; RUNG, J.; TOCCI, N.; ABBEY, D.; BEZERRA, A.; CARRETO, L.; MOURA, G.; BAYÉS, M.; GUT, I.; CSIKASZ-NAGY, A.; CAVALIERI, D.; BERMAN, J.; SANTOS, M. Adaptive Mistranslation Accelerates the Evolution of Fluconazole Resistance and Induces Major Genomic and Gene Expression Alterations in *Candida albicans*. ***mSphere***, v. 4, n. 2, ago. 2017.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, ago. 1996.

YAN, Y.; NIE, L.; TAO, M.; ZHAN, Y.; ZHANG, D. Ketoconazole associated hepatotoxicity: a systematic review and meta-analysis. **Biomed Environ Sci**, v. 26, n. 7, pp. 605-610. jul. 2013.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Clin Risk Manag**, v. 10, p. 95-105. fev. 2013.