



PERFIL DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E SUSCETIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* FRENTE À MOLÉCULAS SELECIONADAS POR VARREDURA VIRTUAL DE QUIMIOTECAS CONTRA O ALVO ALS3.

João Barbato Junior (PIBIC/CNPq-FA-UEM), Cristiane Suemi Shinobu-Mesquita, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Co-orientadora), Érika Seki Kioshima (Orientador), e-mail: eskioshima@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Microbiologia - Biologia e fisiologia dos micro-organismos

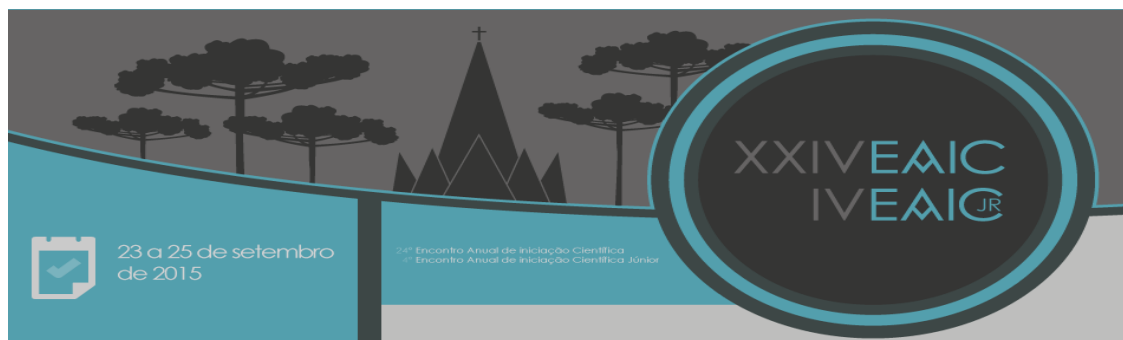
Palavras-chave: Adesão, biofilme e *small molecules*

Resumo:

A incidência de infecções hospitalares por fungos (IHF) tem aumentado substancialmente nas últimas décadas atingindo índices de mortalidade da ordem de 60%. Espécies do gênero *Candida* são as mais frequentemente isoladas, correspondendo a aproximadamente 80% das IHF, estão entre os quatro principais agentes responsáveis por infecções da corrente sanguínea. Além disso, a resistência às drogas atualmente disponíveis e seus efeitos colaterais, apontam para a relevante necessidade de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Um alvo promissor para terapia antifúngica é codificada pelo gene ALS3. Esta adesina atua como um fator de virulência, desempenhando função central em múltiplos processos como: aderência as células do hospedeiro, formação de biofilme, invasão e aquisição de ferro. Vinte e quatro moléculas foram selecionadas por varredura virtual contra o alvo ALS3, das quais cinco apresentaram resultados promissores quanto a capacidade de inibir a adesão e interferir na formação do biofilme de *C. albicans*. Embora não tenha sido observado atividade antifúngica *in vitro*, estas moléculas apresentam um grande potencial no desenvolvimento de novos antifúngico, considerando uma interferência direta na relação patógeno-hospedeiro, ou, ainda, como um adjuvante no processo, seja potencializando a ação de outros antifúngicos ou no tratamento de materiais hospitalares.

Introdução

A incidência de infecções hospitalares por fungos (IHF) tem aumentado substancialmente nas últimas décadas atingindo índices de mortalidade da ordem de 60% (Conde-Rosa *et al.*, 2010). Apesar da crescente ocorrência



de infecções fúngicas invasivas demonstrada por estudos epidemiológicos envolvendo principalmente pacientes internados em UTI, o arsenal antifúngico é ainda restrito. Adicionalmente, tem sido observado o surgimento de resistência aos agentes antifúngicos como anfotericina B e derivados azólicos (Cantón *et al.*, 2011). Este cenário justifica a busca de novas opções antifúngicas para esquemas terapêuticos, sobretudo em pacientes graves. Os avanços nas técnicas computacionais e hardware tem habilitado métodos *in silico* para acelerar a identificação e otimização destas possíveis novas drogas. Pesquisas mostram que essa abordagem pode ser utilizada na identificação e validação de alvos terapêuticos, bem como na identificação e otimização de protótipos. A principal vantagem dos estudos *in silico* é que eles permitem a rápida varredura de grandes bibliotecas de pequenas moléculas (*small molecules*) reduzindo o tempo e os custos para o desenvolvimento de novos fármacos.

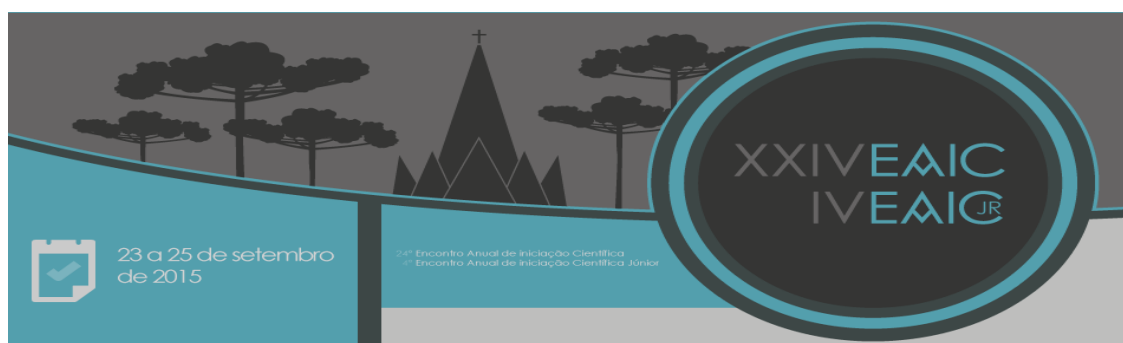
Um alvo promissor para terapia antifúngica e desenvolvimento de vacina é codificada pelo gene *als3*. Esta adesina atua como um fator de virulência, desempenhando função central em múltiplos processos como: aderência às células do hospedeiro, formação de biofilme, invasão e aquisição de ferro (Liu & Filler, 2011). Desta forma, objetivo principal deste trabalho foi avaliar o perfil de adesão, formação de biofilme e susceptibilidade da cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC) frente às moléculas selecionadas por técnicas *in silico* contra ALS3, contribuindo com o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

Materiais e métodos

O perfil de suscetibilidade da *Candida albicans* (ATCC 90028) frente às 24 *small molecules* (SM) (*Life Chemicals*), foi comparada ao fluconazol (FLU). O fluconazol (Galena Química e Farmacêutica) foi preparado em concentrações variando de 0,125 a 64 µg/mL. As 24 *small molecules* foram testadas nas concentrações 1 à 512 µg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (M27-A3 - CLSI, 2008). O critério de leitura considerou que a CIM seria aquela capaz de inibir 80% do crescimento para o fluconazol e 100% para as SM.

Uma suspensão de leveduras padronizadas (2×10^6 células) de *C. albicans* (ATCC90028) em meio RPMI 1640 (Sigma) foi adicionada juntamente com diferentes concentrações de SM (1-512 µg/ml), em placas de 96 poços de poliestireno, e incubada a 37°C sob agitação (120 RPM/min). Após 2h, a capacidade de adesão foi avaliada através da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), em Sabourand Dextrose Agar. Os resultados são representativos de três ensaios independentes.

As preparações foram feitas do mesmo modo da aderência, porém, incubadas durante 24h. Em seguida, o meio foi aspirado do poço, o qual foi



lavado duas vezes com água destilada, para remoção das células não aderentes. A capacidade de formação do biofilme foi executada da mesma forma da aderência, sendo realizados os ensaios em triplicata em dias diferentes.

Resultados e Discussão

Os resultados de suscetibilidade de *C. albicans* frente as 24 moléculas selecionadas contra ALS3, não mostram atividade antifúngica *in vitro*. Todavia, este resultado poderiam ser encontrados, uma vez que o alvo é uma adesina e, a sua inativação não necessariamente teria atividade na células de levedura isolada. No entanto, os resultados relacionados a capacidade de inibir a adesão a superfícies abióticas e formação de biofilme foram promissores. Das 24 moléculas testadas, cinco foram selecionadas (LMM2, LMM4, LMM11, LMM19 e LMM24), por inibir de maneira significativa a adesão das leveduras e a formação de biofilme, etapas importantes no processo de instalação de doenças.

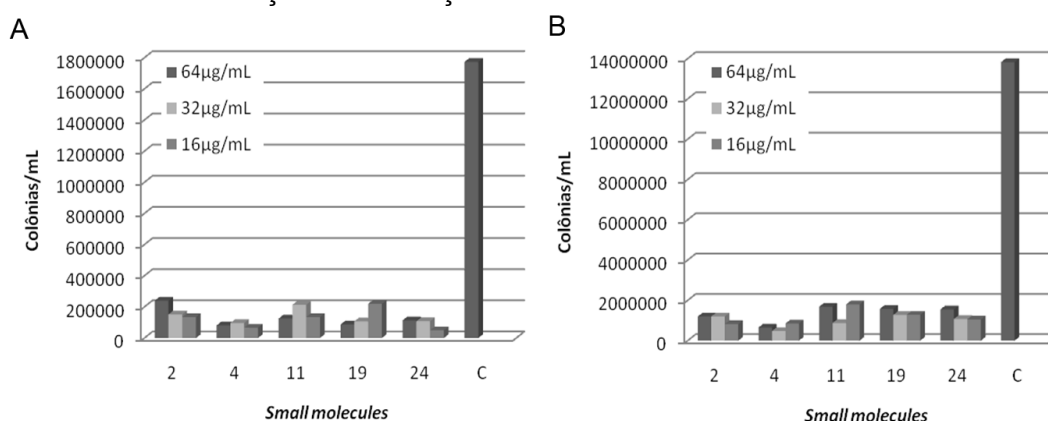
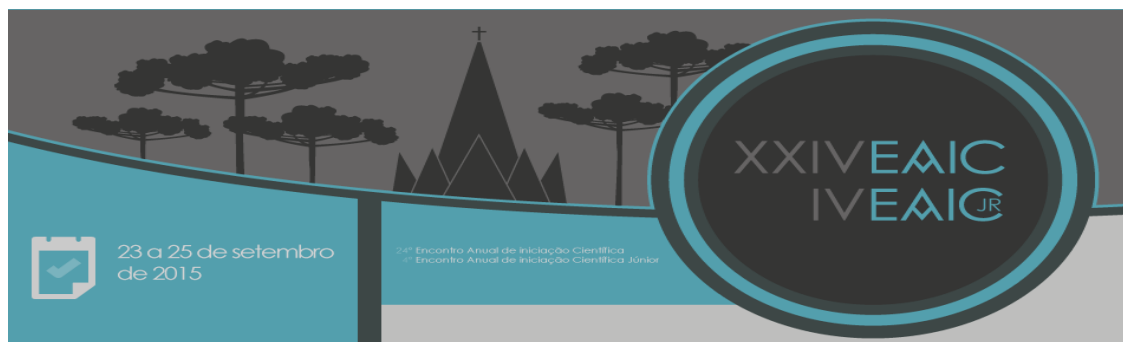


Figura 1: Atividade de cinco *small molecules* (SM) selecionadas por varredura virtual sobre a adesão e formação de biofilme de *C. albicans*. (A) Inibição da adesão de *C. albicans* a microplaca de poliestireno pretratadas com as SM, por contagem de unidade formadoras de colônias. (B) Redução da capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* após tratamento com as SM. 2 – molécula LMM2; 4 – molécula LMM4; 11 – molécula LMM11; 19 – molécula LMM19; 24 – molécula LMM24; C – controle (PBS).

Em seguida, para avaliar se os fenômenos observados eram dose dependentes, novos ensaios foram realizados utilizando concentrações decrescentes dos compostos (16-64 µg/mL) (**Figura 1**).

Uma redução significativa tanto da adesão quanto da capacidade de formação de biofilme foi observada, independente da concentração utilizada. Portanto, efeito de dose-dependência não foi observado. Por outro lado a molécula LMM4, foi a que apresentou melhor desempenho, reduzindo aproximadamente 90% da capacidade de adesão e formação de biofilme.



Conclusões

As moléculas selecionadas apresentam uma ação promissora inibindo a capacidade de adesão de *C. albicans* a superfície abiótica e interferindo na formação de biofilme. Embora não tenha sido observado atividade antifúngica *in vitro*, não se deve excluir o potencial desta moléculas no desenvolvimento de novos antifúngico, considerando uma atuação direta na relação patógeno-hospedeiro ou, ainda, como um adjuvante no processo. Novas perspectivas devem ser investigadas como possível ação sinérgica com outros antifúngicos, ou ainda sua aplicação no tratamento de materiais hospitalares prevenindo a formação de biofilme.

Agradecimentos

Fundação Araucária, CNPq e CAPES

Referências

CANTÓN E. , PEMÁN J. , QUINDÓS G. , ERASO E. , MIRANDA-ZAPICO I. , et al. **Epidemiology, Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis Isolated from Patients with Candidemia: Prospective Multicenter Study.** Antimicrob Agents Chemother. 55(12):5590-6, 2011.

CONDE-ROSA A. , AMADOR R. , PÉREZ-TORRES D. , COLÓN E. , SÁNCHEZ-RIVERA C. , NIEVES-PLAZA M. , GONZÁLEZ-RAMOS M. , BERTRÁN-PASARELL J. **Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center.** P R Health Sci J.29: 26–9, 2010.

LIU Y, FILLER SG. **Candida albicans Als3, a multifunctional adhesin and invasin.** Eukaryot Cell. 10(2):168-73, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard – Third Edition.** CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA, 2008.