

Patrícia de Mello Tavares

**Efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* da
RsAFP2, uma defensina ligante de
glucosilceramida**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores: Leonardo Nimrichter
Marcio Lourenço Rodrigues.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tavares, Patrícia de Mello

Efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* da RsAFP2, uma defensina ligante de Glucosilceramida / Patrícia de Mello Tavares – Rio de Janeiro, 2009.

XI, 58

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Leonardo Nimrichter e Marcio Lourenço Rodrigues.

Referências bibliográficas:f 54

1. Candida 2. Glucosilceramida 3. Defensina 4. Peptídeo Antimicrobiano 5. Antifungicos 6. RsAFP2 I. Nimrichter Leonardo e Rodrigues Marcio Lourenço II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* da RsAFP2, uma defensina ligante de glucosilceramida.

Patrícia de Mello Tavares

**Efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* da RsAFP2, uma
defensina ligante de Glucosilceramida**

Rio de Janeiro, 11 de agosto de 2009

Leonardo Nimrichter, Doutor, Instituto de Microbiologia Professor Paulo
de Góes - UFRJ

Marcio Lourenço Rodrigues, Doutor, Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes - UFRJ

Celuta Sales Alviano, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor
Paulo de Góes - UFRJ

Daniela Sales Alviano, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor
Paulo de Góes - UFRJ

Norton Heise, Doutor, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

André Luis Souza dos Santos, Doutor, Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes - UFRJ

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos Profs: Leonardo Nimrichter e Marcio Lourenço Rodrigues.

Aos meus pais e minhas irmãs por todo o amor, apoio e união em todos os momentos.
Ao Fabrício simplesmente por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu força para continuar meu caminho apesar das adversidades e chegar até aqui.

À minha mãe e ao meu tio, que tenho como um pai, agradeço por todo o amor e dedicação, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao meu pai e meu avô pelo amor que nunca esquecerei que foi muito importante me tornar quem eu sou.

Aos Professores Leonardo e Marcio pela orientação, por muita paciência e por todos os ensinamentos de trabalho, comprometimento e companheirismo.

Ao Professor André pela excelente revisão e principalmente pelos ótimos anos de convívio no laboratório.

A Professora Daniela Alviano por ceder gentilmente alguns isolados de *Candida* e pelas participações em diversas etapas da minha tese.

Ao Professor Allen Norton Hagler, Professor Sergio Fracalanza e a Professora Tyiome Aikiti por ceder gentilmente alguns isolados de *Candida*.

A Professora Sonia Rosental e ao Professor Carlos Taborda da USP pela colaboração no ensaio de microscopia eletrônica e no ensaio *in vivo* respectivamente.

A Dra Karin Thevissen (Centre of Microbial and Plant Genetics, Katholieke Universiteit Leuven Belgium) por gentilmente ceder a RsAFP2 purificada.

A todas as meninas do laboratório pelos bons momentos de convívio e por todo o apoio durante minha passagem pelo laboratório.

À amiga Jú por toda a ajuda na bancada e principalmente pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Fabrício que me ajudou de todas as formas possíveis e impossíveis. Obrigada por todos os dias de contar muitos pontinhos, por todas as horas de treinos de apresentações e principalmente por sempre estar ao meu lado.

As minhas amigas de longa data Lívia, Luisa e Illene obrigada pela amizade eterna.

Ao CNPQ e FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Patrícia de Mello Tavares

Efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* da RsAFP2, uma defensina ligante de Glucosilceramida

Orientadores: Leonardo Nimrichter
Marcio Lourenço Rodrigues.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

A ocorrência de infecções fúngicas tem aumentado nas últimas décadas, sobretudo em pacientes imunossuprimidos. Em paralelo, observa-se um aumento da resistência a drogas antifúngicas, especialmente em cepas do gênero *Candida*. Esses dados têm revelado a importância da busca de novos alvos e drogas que ofereçam tratamento seguro e eficaz. A glucosilceramida (GlcCer), um glicosfingolípido estruturalmente conservado em diferentes espécies fúngicas patogênicas e que apresenta propriedades antigênicas, possui diferenças estruturais significativas quando comparada com seus análogos em células animais. Por esses motivos, GlcCer pode ser apresentada como um bom candidato para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Adicionalmente, a defensina RsAFP2 extraída de semente de rabanete, foram capazes de interagir com GlcCer fúngica levando a morte celular. Em nosso trabalho avaliamos o efeito de

RsAFP2 contra diferentes isolados de *Candida*. A atividade antifúngica de RsAFP2 foi demonstrada por testes de susceptibilidade *in vitro*. Com exceção a *C. glabrata*, que não expressa GlcCer, todas as demais espécies testadas foram sensíveis a RsAFP2, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dublinensis* e *C. krusei*. A expressão de GlcCer em isolados de *C. albicans* com diferentes susceptibilidades e um isolado de *C. glabrata* foi analisada por (cromatografia em camada fina) TLC após a extração dos lipídeos com solventes orgânicos. Nossos resultados sugerem que a susceptibilidade de *C. albicans* a RsAFP2 parece estar relacionada com a quantidade de GlcCer. A ligação de RsAFP2 a superfície fúngica foi avaliada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos policlonais anti-RsAFP2. Esses resultados mostraram que RsAFP2 liga-se preferencialmente a GlcCer presente na parede celular fúngica. RsAFP2 manteve a atividade antifúngica após o tratamento com soro animal. A toxicidade de RsAFP2 a células humanas foi avaliada e nenhuma toxicidade foi encontrada. RsAFP2 se mostrou capaz de controlar a disseminação de *C. albicans*. Nós concluímos que RsAFP2 é um antifúngico promissor capaz de controlar o crescimento fúngico tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Palavras-chave: 1. *Candida* 2. Glucosilceramida 3. Defensina 4. Peptídeo Antimicrobiano 5. Antifúngicos 6. RsAFP2

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

ABSTRACT

Patrícia de Mello Tavares

The antifungal effect *in vitro* e *in vivo* da RsAFP2, a binding Glucosylceramide defensin

Orientadores: Leonardo Nimrichter
Marcio Lourenço Rodrigues.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

The occurrence of fungal infections has increased in recent decades, especially in immunosuppressed patients. In parallel, we have observed an increase in resistance to antifungal drugs in particular strains of the genus *Candida*. These data have shown the importance of searching for new targets and drugs that offer safe and effective treatment. The glucosylceramide (GlcCer), a structurally conserved and antigenic glycosphingolipid in different pathogenic fungal species, presents structural differences compared with their analogues in animal cells. It is also GlcCer appears as a good candidate for the development of antifungal agents. Additionally, the defensin RsAFP2 extracted from seeds of radish, was able to interact with GlcCer leading to cell death. We evaluated the effect of RsAFP2 against different isolates of *Candida*. The

antifungal activity of the RsAFP2 was demonstrated in in vitro susceptibility tests. Except for *C. glabrata*, which did not express GlcCer, all *Candida* species tested were sensitive to RsAFP2, including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dublinensis* and *C. krusei*. The expression of GlcCer in isolates of *C. albicans* with different susceptibilities and one isolate of *C. glabrata* was analyzed by (Thin Layer Chromatography) TLC after extraction of lipids with organic solvents. Our results suggest that the susceptibility of *C. albicans* to RsAFP2 seems to be related to the amount of GlcCer. The binding of RsAFP2 to the fungal surface was evaluated by indirect immunofluorescence, using polyclonal antibodies anti-defensin. The results showed that RsAFP bound to GlcCer mainly in the fungal cell wall. RsAFP2 maintained the antifungal activity after treatment with animal serum. The toxicity of RsAFP2 to human cells was evaluated by LDH test and no toxicity was found. RsAFP2 control the spread of *C. albicans* in a murine model of candidiasis prophylaxis in more effective way than fluconazole. We conclude that RsAFP2 is a promising antifungal compound able to control the fungal growth both *in vitro* and *in vivo*.

Palavras-chave: 1. *Candida* 2. Glucosylceramide 3. Defensin 4. Antimicrobial Peptide 5. Antifungal 6. RsAFP2

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – “*ATP-binding cassette*” cassete ligante de ATP
AMP – peptídeos antimicrobianos
CDH – dihexosilceramida
Cer:GlcT – ceramida glucosiltransferase
CMH – monohexosilceramida
DmAMP1– “*Dahlia merckii* antimicrobial peptide 1” peptídeo antimicrobiano de *Dahlia merckii*
FDA – “food and drug administration” Administração de Alimentos e Drogas
FITC – isotiocianato de fluoresceína
FucT – fucosiltransferase
GalCer – galactosilceramida
GalGlcCer – galactosilglucosilceramida
GalNAcT – N-acetilgalactosaminil transferase
GalT – galactosiltransferase
GIPCs – glicosilinositolfosforilceramidas
GlcCer – Glucosilceramida
GlcNAcT – N-acetilglucosaminil transferase
GSL – glicosfingolipídeos
HPTLC – cromatografia em camada fina de alta eficiência
IS – infecções sistêmicas
IPC – inositolfosforilceramida
LacCer – lactosilceramida
LDH – lactato desidrogenase
MFS – família de transportadores principais
MIPC – manosil-inositolfosforilceramida
M(IP)₂C – manosil-(inositol-P)₂-ceramida
SAPs – aspartil proteinases
PKC – proteína quinase C
PLs – fosfolipases
SFB – soro fetal bovino
SialT – sialiltransferase
ST – sulfotransferase
ROS – espécies reativas de oxigênio
RsAFPs – “*Raphanus sativus* antifungal protein” Proteína antifúngica de *Raphanus sativus*
TEM – microscopia eletrônica de transmissão

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Tratamento de infecções fúngicas sistêmicas	3
1.2	Infecções por <i>Candida ssp</i>	6
1.3	Possíveis alvos para novos agentes antifúngicos	11
1.3.1	Glicosfingolipídeos (GSL) como alvos para agentes antifúngicos	12
1.4	Peptídeos Antimicrobianos	17
1.5	Defensinas	21
1.6	Proteína antifúngica isolada de <i>Raphanus sativus</i> (“<i>Raphanus sativus</i> antifungal protein” - RsAFPs)	23
2	Objetivos	27
3	Materiais e Métodos	28
4	Resultados	34
5	Discussão	45
6	Conclusões	54
7	Bibliografia	55
8	Anexo	60

1- Introdução:

O número de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Um estudo epidemiológico feito de 1979 à 2000 nos Estados Unidos revelou que a incidência de sepse por ano aumentou durante esse período de 82 casos por 100.000 pacientes para 240 casos por 100.000 pacientes. Ainda neste estudo, quando o número de casos foi organizado de acordo com o agente etiológico (Figura 1), as infecções causadas por fungos apresentaram um aumento de 207%, de 5231 casos em 1979 para 16.042 casos em 2000 (MARTIN *et al.*, 2003).

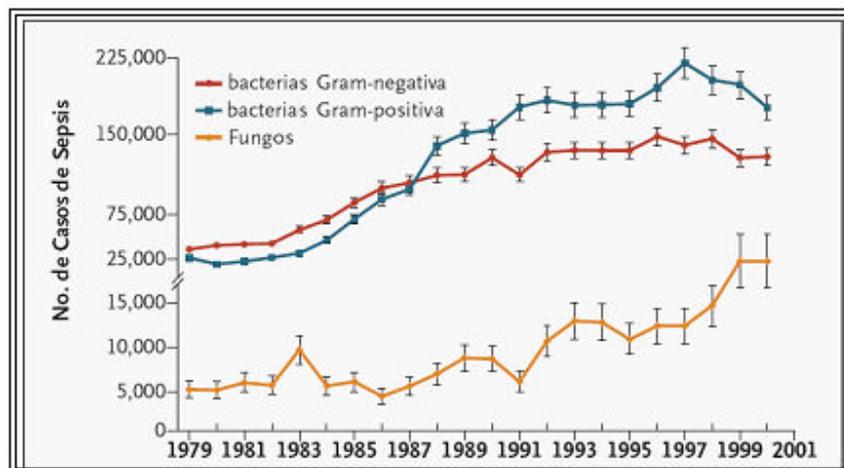


Figura 1: Número de casos de sepsis nos Estados Unidos de acordo com o agente etiológico 1979-2000 (MARTIN *et al.*, 2003).

Diversos fatores têm contribuído para o aumento das infecções fúngicas sistêmicas. Dentre esses fatores, o principal é o aumento da população de imunocomprometidos devido a alterações no número e função dos neutrófilos ou na imunidade mediada por células; causados pelo uso de corticosteróides, por tratamentos quimioterápicos ou, ainda, por processos patológicos e infecciosos, onde se destacam os indivíduos que desenvolvem a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, a disfunção metabólica, idade avançada, o uso de antibióticos de amplo espectro, o transplante de órgãos e

outros procedimentos invasivos, tais como nutrição parenteral, uso de cateteres intravasculares e grandes cirurgias, também aumentam o risco de infecções por fungos oportunistas (CHAPMAN, SULLIVAN & CLEARY 2008; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

A lista de fungos oportunistas que podem causar infecções graves aumenta a cada ano sendo as espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, as que se apresentam como as mais freqüentes em número de casos (Tabela 1). Dentre esses fungos o mais importante agente causador de micoses oportunistas permanece sendo o gênero *Candida* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Aliado a isso, fungos outrora considerados colonizadores ou contaminantes vêm se destacando como emergentes, causando infecções letais (por exemplo *Scedosporium prolificans* e *Fusarium* spp). Essas infecções emergentes são difíceis de diagnosticar, pois nos principais exames para diagnóstico, só são positivas em aproximadamente 50% dos casos. Além disso, as infecções causadas por esses patógenos são responsáveis por uma alta taxa de morbidade e mortalidade mesmo com a administração das terapias antifúngicas recomendadas (RICHARDSON & LASS-FLÖRL, 2008).

Tabela 1: Principais fungos causadores de infecções oportunistas (número de casos e taxa de fatalidade). Adaptado de PFALLER & DIEKEMA, 2007.

Organismos	Nº de casos/ milhão/ano	Casos/taxa de fatalidade (%)
Leveduras		
Espécies de <i>Candida</i>	72.8	33.9
Espécies de <i>Cryptococcus</i>	65.5	12.7
Filamentosos		
Espécies de <i>Aspergillus</i>	12.4	23.3
Zigomicetos	1.7	30.0
Outros hialohifomicetos	1.2	14.3

1.1- Tratamento de infecções fúngicas sistêmicas:

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado. Isto se deve a reduzida disponibilidade de alvos e principalmente, devido à estreita similaridade entre as células fúngicas e as células humanas. Os principais antifúngicos utilizados têm como alvo o ergosterol (o principal esteroide encontrado na membrana celular dos fungos), seu processo biossintético ou a biossíntese da parede celular (COWEN & STEINBACH, 2008). Dentre os principais antifúngicos que se associam ou inibem a síntese do ergosterol estão a anfotericina B e os derivados azólicos.

A anfotericina B é um composto poliênico que vem sendo clinicamente explorado por mais de 50 anos. Sua formulação convencional, para uso médico, requer a presença do deoxicolato de sódio, cuja finalidade é solubilizá-la em água e estabilizar a suspensão na forma de micelas. A anfotericina B liga-se diretamente ao ergosterol formando poros ou canais na superfície fúngica (Figura 2). O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que promove a perda de constituintes citoplasmáticos, levando à morte celular. (COWEN, 2008).

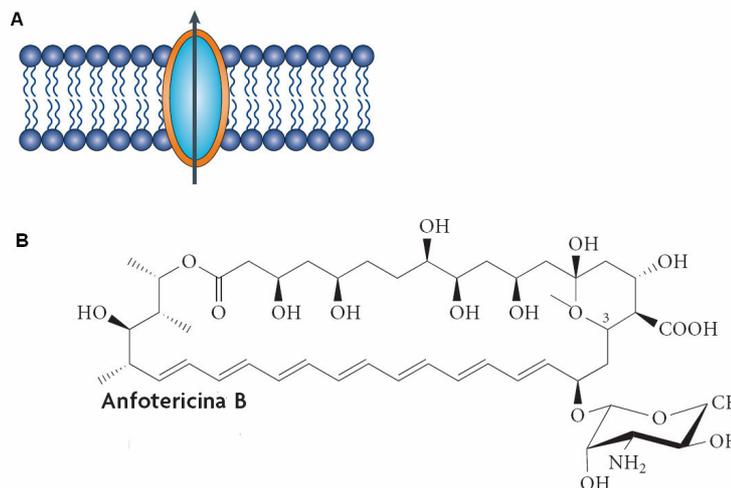


Figura 2: (A) Representação do mecanismo de ação da anfotericina B: liga-se diretamente ao ergosterol na membrana celular fúngica formando poros ou canais na superfície fúngica levando a perda de componentes celulares e a lise osmótica. (B) Estrutura química da anfotericina B. Modificado de COWEN, 2008.

Embora a anfotericina B seja um antibiótico de amplo espectro, sua administração é comprometida pela toxicidade em altas concentrações. As reações imediatas à infusão decorrem da liberação de interleucinas e prostaglandinas, manifestando-se como febre, calafrios, taquicardia, hipertensão arterial, náuseas e vômitos (MARTINEZ, 2006). Os efeitos adversos tardios relacionam-se diretamente com a dose cumulativa recebida de anfotericina B e, também, com a sensibilidade e condições orgânicas do paciente. Os mais comuns são a nefrotoxicidade e a anemia, que requerem correção de doses e de intervalos da administração e eventualmente obrigam a uma suspensão da terapia (MARTINEZ, 2006).

Nos últimos anos três formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas e aprovadas para uso pelo FDA: (i) anfotericina B lipossomal, (ii) anfotericina B complexo lipídico e (iii) a anfotericina dispersão coloidal. Todas as três formulações são geralmente menos nefrotóxicas que a anfotericina B convencional e atingem maiores concentrações no fígado, baço e pulmões, porém são discretamente mais hepatotóxicas que a formulação convencional e têm custo elevado (CHAPMAN, SULLIVAN, & CLEARY, 2008). Recentemente, nanopartículas vêm sendo testadas como carreadoras de anfotericina B e apresentam efeito similar *in vitro* além de toxicidade reduzida (NAHAR *et al*, 2008).

Um outro grupo de antifúngicos é composto pelos derivados azólicos, caracterizados pela presença de um anel pentagonal na estrutura molecular. Esse anel pode conter três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). Considerando as drogas de uso sistêmico, o subgrupo dos imidazóis compreende o miconazol e o cetoconazol. Dentre os triazólicos temos o fluconazol e o itraconazol, triazóis de primeira geração, e voriconazol, posaconazol e ravuconazol, triazóis de segunda geração. Normalmente são bem tolerados, apresentam atividade contra diversos fungos e vêm sendo os antifúngicos mais utilizados nas últimas décadas (MARTINEZ, 2006). O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da lanosterol 14 α -demetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450,

que cataliza um dos últimos passos na biossíntese do ergosterol. Dessa forma, os azóis reduzem a presença do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de um intermediário tóxico, 14 α -metilados, principalmente lanosterol e 14 α -metil-3,6-diol promovendo a desestabilização da membrana e lise celular (Figura 3).

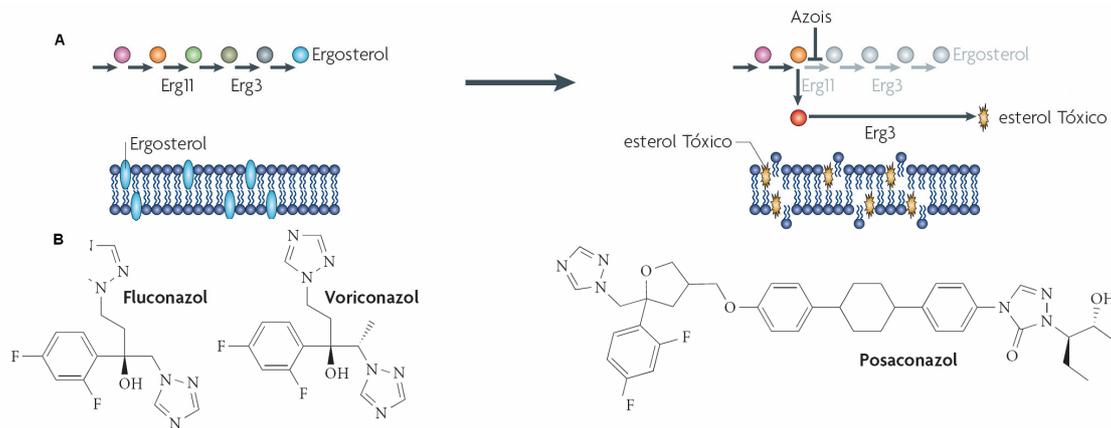


Figura 3: (A) Representação do mecanismo de ação de compostos azólicos: inibem a enzima 14- α -demetilase, codificada pelo gene *Erg11* em *C. albicans*, bloqueando a síntese do ergosterol e levando ao acúmulo de esteróis tóxicos, promovendo desestabilização da membrana e lise celular (B) Estrutura química dos azóis: fluconazol, voriconazol e posaconazol. Modificado de COWEN, 2008.

A resistência aos azóis vem sendo descrita como uma importante causa de falhas no tratamento. Os principais efeitos adversos das drogas azólicas relacionam-se com intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade (MARTINEZ, 2006). E, além disso, estão associados a diversas interações medicamentosas por interferir com enzimas do citocromo P450 intestinais e hepáticas (CHAPMAN, SULLIVAN & CLEARY, 2008).

Nos últimos anos apenas uma nova classe de droga com mecanismo de ação diferente das drogas correntes foi descrita e vem sendo utilizada na terapêutica, o grupo das equinocandinas. As equinocandinas, como caspofugina e micafugina, são inibidores não-competitivos da β -(1,3)-glucana sintase interferindo com a síntese de glucana, um componente estrutural essencial para a rigidez da parede celular, resultando em dano na parede e morte celular (Figura 4) (COWEN, 2008). Diferente dos azóis, as equinocandinas apresentam

uma baixa frequência de toxicidade e menores interações medicamentosas. Apesar disso, seu espectro de ação é restrito e a administração exclusivamente endovenosa, fato que diminuem seu uso clínico (MARTINEZ, 2006). Os efeitos adversos mais relatados são reações a infusões como vermelhidão, coceira e efeitos gastrintestinais (CHAPMAN, SULLIVAN & CLEARY, 2008).

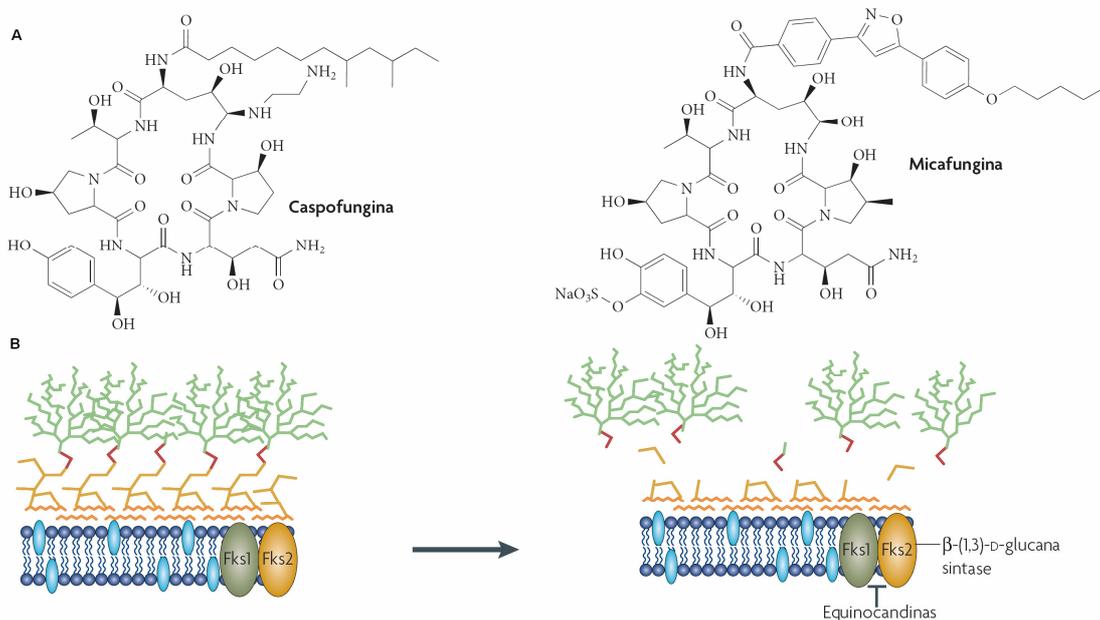


Figura 4: (A) Estrutura química das equinocandinas: caspofungina e micafungina. (B) Representação do mecanismo de ação de equinocandinas: inibidores não-competitivos da β -(1,3)-glucana sintase (a subunidade catalítica é codificada por FKS1 em *C. albicans*) interferindo com a síntese de glucana, um componente estrutural essencial para a rigidez da parede celular, resultando em dano na parede e morte celular. Modificado de COWEN, 2008.

1.2- Infecções por *Candida* spp

Conforme citado anteriormente, dentre os vários fungos capazes de causar infecção em humanos temos como destaque absoluto os fungos do gênero *Candida* como os principais causadores de micoses oportunistas (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Espécies de *Candida* colonizam e / ou infectam diversos e distintos sítios anatômicos como pele, cavidade oral e esofágica, trato

gastrointestinal, vaginal e sistema vascular (YANG, 2003). Fungos desse gênero são encontrados no trato gastrointestinal de 20 a 80% da população adulta saudável. No entanto, estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

As infecções causadas por espécies do gênero *Candida* podem levar uma variedade de quadros que incluem desde infecções simples de mucosa, geralmente em pessoas que não apresentam quadros de imunossupressão, até infecções sistêmicas denominadas de candidíase invasiva (COWEN & STEINBACH, 2008). Essas infecções invasivas estão associadas à diminuição da imunidade e resultam em taxas de mortalidade entre 10-49%, em um longo tempo de permanência no hospital e a altos custos (RICHARDSON & LASS-FLÖRL, 2008). Infecções por *Candida* spp representam a quarta maior causa de infecções sistêmicas (IS) nos Estados Unidos sendo responsável por 8 a 10% de todas as IS adquiridas em hospitais (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Em um estudo feito recentemente no Brasil, *Candida* spp também representa a quarta causa de IS, porém com taxas de 2 a 15 vezes maiores do que estudos feitos no hemisfério norte (COLOMBO *et al.*, 2006).

São conhecidas mais de 100 espécies de *Candida*. Destas, mais de 17 espécies já foram descritas como agentes causadores de candidíase sistêmica em humanos. Aproximadamente 95% dos casos de candidemia (presença de *Candida* na corrente sanguínea) são causados por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. (PFALLER & DIEKEMA, 2007). A espécie *C. albicans* é, sem dúvida alguma, a mais frequentemente isolada desde infecções superficiais a invasivas em todo o mundo. A frequência dessas espécies isoladas varia de acordo com a região; na América Latina e Europa, por exemplo, foram documentadas taxas de 44% e 62%, respectivamente, para infecções sistêmicas causadas por *C. albicans*. (RICHARDSON M & LASS-FLÖRL, 2008)

C. albicans é uma levedura com um potencial patogênico bastante conhecido, que apresenta como principais fatores de virulência a capacidade de

aderência a diferentes mucosas e epitélios (pela presença de adesinas em sua superfície), a diferenciação com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular (formação de tubo germinativo), a produção de enzimas como aspartil proteinases (SAPs), que degradam muitas proteínas humanas como albumina, queratina, imunoglobulina A e fosfolipases (PLs), que hidrolizam ligações éster de glicerofosfolípídeos (YANG, 2003). Além disso, outros mecanismos como persopção e indução da fagocitose também podem participar diretamente da invasão tissular (Figura 5) (CALDERONE & FONZI, 2001).

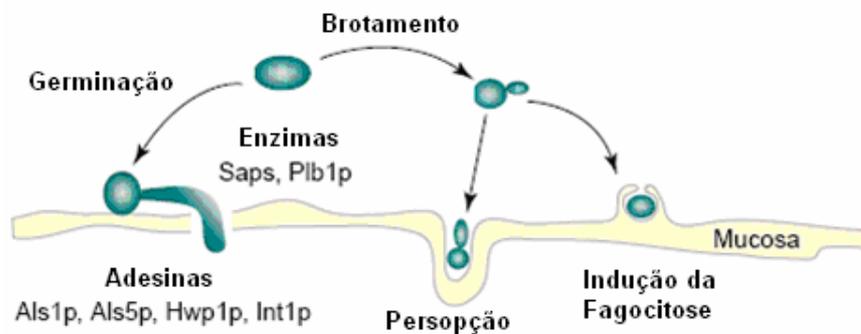


Figura 5: Mecanismos que podem estar envolvidos na invasão tissular em *C. albicans*. A levedura pode brotar (à direita) ou germinar (à esquerda). Na superfície da mucosa é mostrada a germinação da levedura (à esquerda) e penetração na mucosa. Contudo, persopção de levedura (centro) resulta na absorção das células em brotamento. Adicionalmente, a indução da fagocitose (mais à direita) pela mucosa também pode ocorrer. Estes eventos são promovidos pelas adesinas (Als1p, Als5p, Hwp1p e Int1p) e enzimas (Saps e Plb1p). Modificado de CALDERONE & FONZI, 2001.

Embora *C. albicans* permaneça como a espécie mais freqüente, estudos epidemiológicos mais recentes têm demonstrado sua diminuição associado a um paralelo aumento nas taxas de candidemias causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). No início da década de 90, a espécie *C. albicans* representava cerca de dois terços das infecções por *Candida*, diminuindo para cerca de 50% no final da década (Figura 6). Inversamente, durante este mesmo período de estudo, ocorreu o aumento das outras espécies (MASCHMEYER, 2006). A espécie *C. glabrata* é a principal causadora de candidemia por espécies não-*albicans* nos Estados Unidos

(PFALLER & DIEKEMA, 2007), porém, no Brasil, a *C. glabrata* é mais rara. Estudos realizados no Brasil descreveram que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* representam juntas 70% das espécies não-*albicans* mais freqüentes causadoras de candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006).

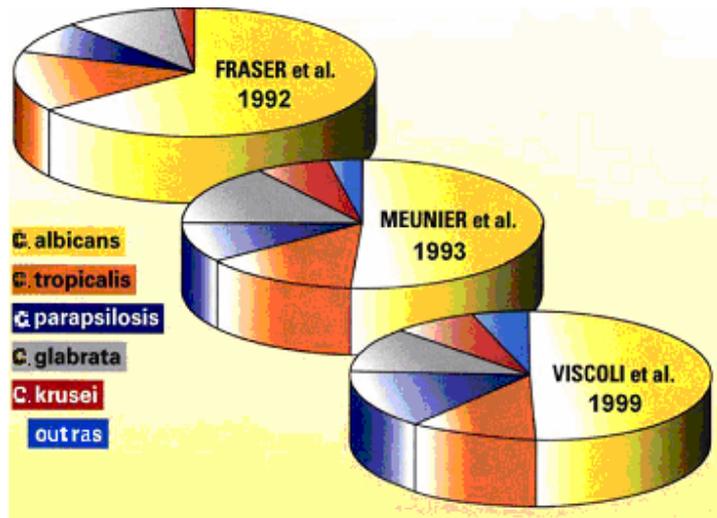


Figura 6: Mudanças, em função do tempo, das espécies predominantes em candidemia (MASCHMEYER, 2006).

As razões para a emergência de espécies não-*albicans* ainda não são completamente conhecidas, mas algumas condições clínicas podem aumentar o risco de desenvolvimento de candidemia por espécies não-*albicans*. Por exemplo, *C. parapsilosis* vem sendo associada a paciente com cateter vascular e nutrição parenteral, *C. tropicalis* associada com câncer e neutropenia, enquanto *C. krusei* e *C. glabrata* são relacionadas a exposições prévias a compostos azólicos (COLOMBO *et al.*, 2006).

Os tratamentos iniciais para as infecções sistêmicas causadas pelo gênero *Candida* podem ser guiados combinando a epidemiologia do local com os fatores de riscos apresentados pelos pacientes. Usualmente *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são susceptíveis a compostos poliênicos, azóis e equinocandinas. A *C. glabrata* é menos susceptível à fluconazol e *C. krusei* é intrinsicamente resistente a esse derivado azólico (RICHARDSON & LASS-FLORL, 2008). As equinocandinas apresentam atividade antifúngica frente as principais

espécies de *Candida*, porém casos de redução da susceptibilidade em isolados clínicos seguido do aumento do uso das equinocandinas vem sendo observados em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SHAO, HUANG, & HSUEH, 2007). Os agentes antifúngicos mais utilizados como tratamento primário, de acordo com um estudo realizado no Brasil, para candidemia são a anfotericina B e fluconazol seguido pelas equinocandinas (COLOMBO *et al.*, 2006).

A falta de resposta a uma terapia antifúngica pode ser devido à resistência *in vitro* (intrínseca ou desenvolvida durante a terapia) ou resistência clínica; esta última é associada a vários fatores relacionados ao hospedeiro, ao agente antifúngico ou ao isolado infectante (ESPINEL-INGROFF, 2008).

Os mecanismos de resistência aos azóis em *C. albicans* mais prevalentes são: a mutação ou superexpressão do alvo, a enzima lanosterol 14 α -demetilase (codificada pelo gene *Erg11*) e a superexpressão de bombas de efluxo da família dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e da classe dos facilitadores principais (MFS) (ESPINEL-INGROFF, 2008). A mutação irá impedir a ligação do azol enquanto a superexpressão mantém o funcionamento mesmo na presença da droga. Os transportadores diminuem a concentração da droga no interior da célula (ESPINEL-INGROFF, 2008). Outro mecanismo menos comuns é a perda da função da esterol 5,6 desaturase (codificada pelo gene *Erg3*), uma enzima envolvida no último passo da síntese de ergosterol que bloqueia o acúmulo do intermediário tóxico quando *Erg11* é inibido pelo azol (COWEN & STEINBACH, 2008).

Assim como acontece com os azóis um mecanismo de resistência no qual as células fúngicas diminuem o impacto das equinocandinas também é a mutação do alvo. O mecanismo mais comum é a mutação em Fks1, que é a subunidade catalítica do alvo das equinocandinas (COWEN & STEINBACH, 2008). Nesta mesma classe de antifúngicos também podemos observar em *C. albicans* a síntese compensatória de outros componentes da parede celular como quitina, via sinalização por proteína quinase C (PKC), que sinaliza a integridade da parede celular (COWEN & STEINBACH, 2008).

Os mecanismos de resistência à anfotericina B, ainda não são bem entendidos, mas a redução da quantidade de ergosterol ou sua ausência na

membrana celular fúngica foi associada com sua resistência sem afetar a viabilidade celular (ESPINEL-INGROFF, 2008).

O fenômeno de resistência se torna ainda mais severo uma vez que é frequentemente acompanhado pela aquisição de múltiplos mecanismos de pelo mesmo isolado, levando ao surgimento de altos níveis de resistência (COWEN & STEINBACH, 2008).

1.3- Possíveis alvos para novos agentes antifúngicos:

Diante do cenário que foi apresentado acima, diferentes grupos de pesquisa vêm focando suas atenções para o desenvolvimento de agentes antifúngicos ainda mais eficazes e menos tóxicos. Principalmente para os quadros de infecção fúngica sistêmica, os mais graves e letais. No entanto, conforme citado anteriormente, a estreita similaridade entre as células fúngicas e as de mamíferos limita as alternativas de tratamento. Nesse contexto, a busca de alvos específicos se mostra necessária para o desenvolvimento de drogas seguras e eficazes (LIU *et al.*, 2006).

Dentre os possíveis alvos, moléculas presentes na parede celular são consideradas como alvos relevantes para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Isso se deve à localização e relevância funcional das moléculas ali encontradas, tais como: manoproteínas, quitinas, α -glucanas e β -glucanas, dentre outras (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006). A parede celular fúngica é importante na fisiologia desses microrganismos em diferentes aspectos, tais como: morfogênese, interação célula-célula, interação célula-matriz, e proteção osmótica e física (NIMRICHTER *et al.*, 2005 b). Os estudos de caracterização química sobre parede celular fúngica vêm sendo baseados na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse organismo a parede celular é composta basicamente de glucanas e quitinas, polissacarídeos encontrados em todas as espécies fúngicas conhecidas. A composição e o arranjo estrutural proposto para a arquitetura da parede celular foram responsáveis pelas sugestões funcionais descritas acima. No entanto, dados recentes vêm demonstrando que a parede celular fúngica é muito mais dinâmica do que parece. Nesse contexto,

se destacam as paredes celulares estudadas em espécies fúngicas patogênicas. Diferentes componentes associados com mecanismos de virulência e processos fisiológicos vêm sendo descritos nessa região. A presença de enzimas, proteínas de choque térmico, glicosfingolipídeos (GSL), melanina e histonas vêm revelando novos alvos para agentes antifúngicos (NIMRICHTER *et al.*, 2005 b).

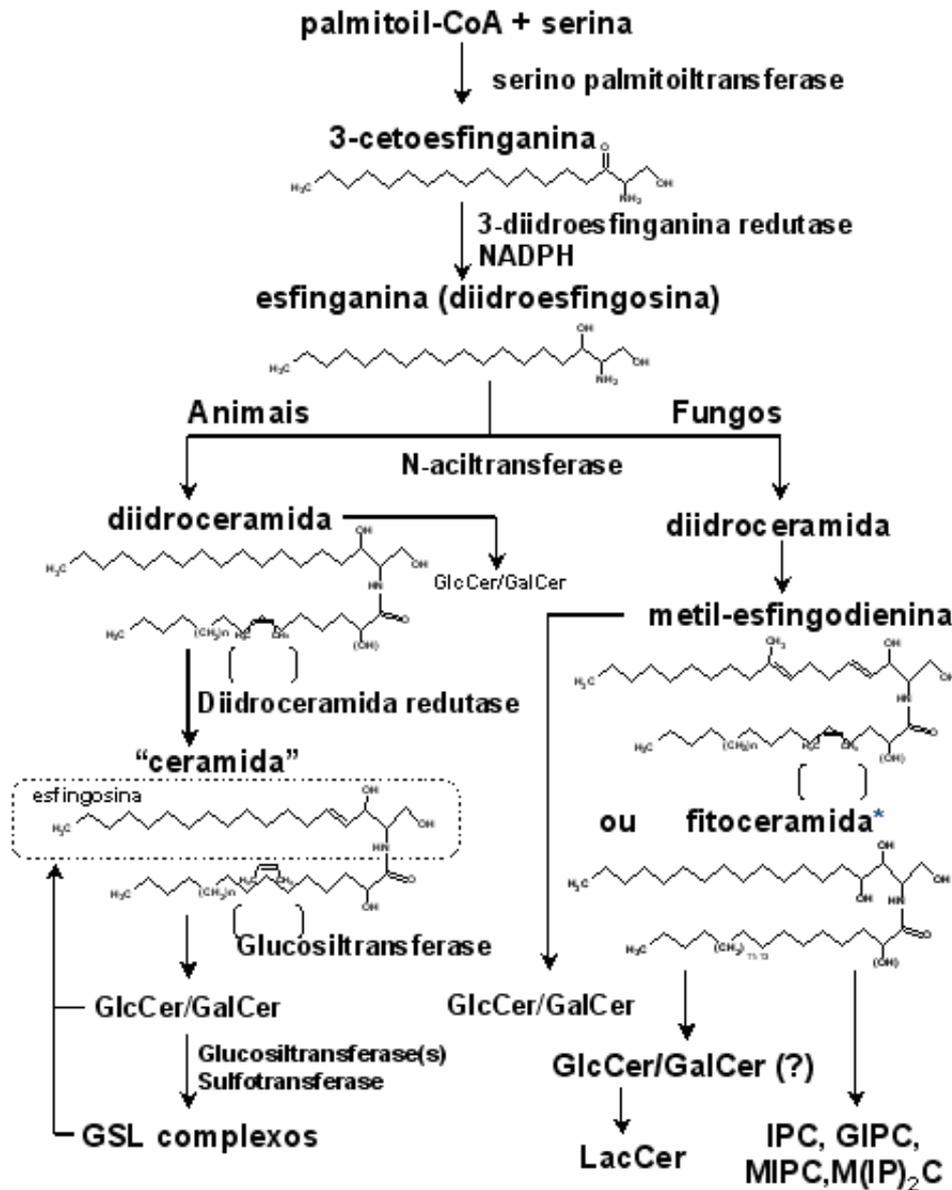
1.3.1- Glicosfingolipídeos (GSL) como alvos para agentes antifúngicos.

Os GSL consistem de uma porção lipídica, denominada ceramida, ligada a uma porção polar composta por um ou mais açúcares. Essas moléculas estão envolvidas, em mamíferos, com o crescimento celular, sinalização intracelular, adesão microbiana, apoptose e endereçamento de proteínas para a superfície celular (HAKOMORI, 2003).

Embora o perfil de GSL expresso seja dependente do tipo de célula estudada, a via biossintética dessas moléculas apresenta etapas básicas em comum para todas as células eucarióticas. A porção ceramida dos GSL pode ser sintetizada “de novo” no retículo endoplasmático ou pode ser gerada pela degradação ou “turnover” de glicosfingolipídeos complexos (MERRIL *et al.*, 1997; OBEID, OKAMOTO & MAO, 2002). Paralelamente, a ceramida pode também ser obtida a partir da oferta de esfingolipídeos completos para as células em questão (MERRIL *et al.*, 1997; OBEID, OKAMOTO & MAO, 2002). A seqüência de reações que levam a formação dos GSL está descrita na Figura 7. Vale ressaltar que a partir da formação da esfinganina ou diidroesfingosina, são observadas diferenças biossintéticas significativas entre diferentes células eucarióticas como animais, plantas e fungos (Obeid, Okamoto & Mao, 2002).

A etapa final na formação do mais simples GSL é a adição de um monossacarídeo no carbono 1 da ceramida, tendo como produto as monohexosilceramidas ou cerebrosídeos (CMHs). As glicosiltransferases são as enzimas responsáveis pela transferência do açúcar para a ceramida, dando continuidade à biossíntese dos GSL. De acordo com o resíduo sacarídico transferido, o CMH pode ser denominado glucosilceramida (GlcCer - adição de

glucose) ou galactosilceramida (GalCer - adição de galactose). Tipos celulares contendo outros monossacarídeos já foram encontrados, mas a GlcCer e a GalCer são os mais comuns (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004).



* também descrita na epiderme de mamíferos

Figura 7: Biossíntese de glicosíngolipídeos. As siglas representam: GalCer (galactosilceramida), GSL (glicosíngolipídeo), GIPC (glicosilinositolfosforilceramida), GlcCer (Glucosilceramida), IPC (inositolfosforilceramida), LacCer (lactosilceramida), MIPC (manosilinositolfosforilceramida) e M(IP)₂C (manosil-[inositol-P]₂-ceramida).

A formação de GSL mais complexos envolve a participação de outras glicosiltransferases (galactosiltransferase - GalT, N-acetilglucosaminotransferase - GlcNAcT, N-acetilgalactosaminotransferase - GalNAcT, fucosiltransferase - FucT, sialiltransferase - SialT e sulfotransferase - ST) e tem como precursor a GlcCer, com exceção dos sulfolipídeos, que utilizam GalCer (MACCIONI, DANIOTTI & MARTINA, 1999; MARCUS & POPKO, 2002). Por outro lado, em fungos, a extensão da glicosilação dos cerebrosídeos se limita à adição de um segundo resíduo sacarídeo de Gal dando origem a lactosilceramida (LacCer ou GalGlcCer), uma dihexosilceramida (CDH) (MACIEL *et al.*, 2002). Seguindo outra via biossintética, uma diferente classe de GSL contendo fosfato pode ser formada nos fungos pela associação de mono e oligossacarídeos à ceramida via uma unidade de *myo*-inositol, formando os GSL denominados glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs) (HEISE *et al.*, 2002).

Nos fungos a via biossintética da ceramida segue um caminho distinto. A síntese das GIPCs, estruturas que não serão abordadas em maiores detalhes nessa Dissertação, requer a formação da fitoesfingosina, uma base de cadeia longa trihidroxilada. As principais classes de GIPCs presentes em membranas de *S. cereviae* são inositolfosforilceramida (IPC), manosil-inositolfosforilceramida (MIPC) e manosil-(inositol-P)₂-ceramida (M(IP)₂C) que também são expressas em outros fungos (THEVISSSEN *et al.*, 2005). Devido a processos biossintéticos diferenciados, as GlcCer fúngicas apresentam, também, estruturas diferentes daquelas encontradas em animais (Figura 8) apresentando um grupamento metil no carbono 9 e uma insaturação entre os carbonos 8 e 9, formando a metil-esfingodienina (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004).

Recentemente foi descrito que a metilação da base de cadeia longa, etapa exclusivamente observada em células fúngicas, é essencial para o crescimento e diferenciação de *Fusarium graminearum* (RAMAMOORTHY *et al.*, 2009). Duas enzimas foram descritas como envolvidas nessa etapa biossintética, a FgMT1 e FgMT2. Embora o mutante FgMT1 tenha seu crescimento similar à cepa selvagem, o FgMT2 apresentou alterações significativas no crescimento (RAMAMOORTHY *et al.*, 2009). A presença da insaturação na base de cadeia longa dos CMHs de fungos também parece ser

uma etapa biossintética relevante. Em leveduras de *C. albicans* quando a esfingolipídio Δ^8 desaturase é bloqueada, observa-se uma taxa reduzida no crescimento de hifas quando comparada com a estirpe selvagem (OURA & KAJIWARA, 2008). Além disso, diferente do que é observado em células animais, a grande maioria dos ácidos graxos presentes na ceramida dos fungos é hidroxilado (BARRETO-BERGTER, RODRIGUES & PINTO, 2004).

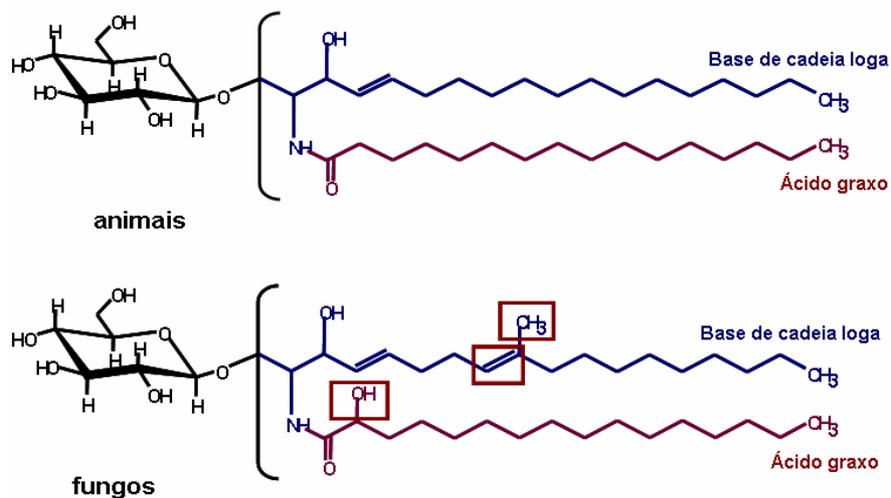


Figura 8: Diferenças estruturais encontradas entre as GlcCers de fungos e animais.

Além da participação como componente estrutural de membrana, novas funções vêm sendo sugeridas para GlcCer. Em 2000, nosso grupo descreveu a presença de anticorpos anti-GlcCer no soro de indivíduos com criptococose, sugerindo a imunogenicidade dessas moléculas (RODRIGUES *et al.*, 2000). Os anticorpos foram purificados e reagiram de forma cruzada com GlcCer isolados de outras espécies fúngicas, além de inibir, *in vitro*, o brotamento do *Cryptococcus neoformans*. Esses dados sugeriram pela primeira vez o envolvimento dessas estruturas no processo replicativo do fungo e o efeito provocado pelos anticorpos foi, na época, relacionado com a biossíntese da parede celular. A conjugação desses anticorpos com ouro coloidal revelou a presença de GlcCer na parede celular, e levantou a hipótese de que as GlcCer poderiam ser responsáveis pela chegada de componentes necessários para sua construção e organização (RODRIGUES *et al.*, 2000). Além de sugerir o

envolvimento da GlcCer com a biossíntese de parede, esses dados revelaram, também pela primeira vez, a presença de GSL como componentes da parede celular. A capacidade de anticorpos anti-GlcCer em bloquear a diferenciação fúngica foi confirmada em *Pseudallescheria boydii* e *C. albicans* (PINTO *et al.*, 2002). Esses mesmos anticorpos foram microbicidas frente à forma infectiva do fungo patogênico *Fonsecaea pedrosoi*, o principal agente etiológico da cromoblastomicose humana. Quando pré-incubados com o fungo, esses anticorpos foram, ainda, capazes de aumentar o índice de fagocitose e a atividade microbicida de macrófagos murinos, o que sugere a presença dessas moléculas na parede celular desse fungo, conforme observado para *C. neoformans* (NIMRICHTER *et al.*, 2004).

Mais recentemente, Rittershaus e colaboradores demonstraram que a GlcCer é necessária para o crescimento de *C. neoformans* em ambientes não-ácidos extracelulares, sendo considerado um importante regulador de virulência. Nesse mesmo estudo, camundongos inoculados com o fungo no qual a enzima glucosilceramida sintase foi nocauteada apresentaram uma sobrevivência maior quando comparados com aqueles tratados com a cepa selvagem (RITTERSHAUS *et al.*, 2006).

O fato dos anticorpos anti-GlcCer serem capazes de inibir o dimorfismo de algumas espécies fúngicas, e, em alguns casos, exercerem um efeito fungicida direto sugere que essas imunoglobulinas poderiam ser utilizadas para controlar uma infecção fúngica. Nosso grupo demonstrou que anticorpos monoclonais anti-GlcCer aumentam significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com doses letais de *C. neoformans*. No entanto, o mecanismo de ação desses anticorpos e o seu efeito em outras infecções sistêmicas ainda permanecem desconhecido (RODRIGUES *et al.*, 2007). Aliado a isso, as GlcCer são estruturalmente conservadas na maioria das espécies fúngicas, especialmente aquelas patogênicas ao homem (BARRETO-BERGTER, RODRIGUES & PINTO, 2004).

Assim, uma série de fatores sugere que a GlcCer merece destaque no que diz respeito a um potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos: (i) apresentam estrutura e processos biossintéticos diferenciados

das GlcCer encontrados em células animais; (ii) são moléculas extremamente conservadas entre as diferentes espécies fúngicas, especialmente àquelas patogênicas ao homem; (iii) estão envolvidas em processos fisiológicos essenciais para o desenvolvimento fúngico; (iv) se mostram envolvidas com o mecanismo de dimorfismo, um fator de virulência crucial na adaptação dos fungos no tecido hospedeiro e (v) são enriquecidas na parede celular desses organismos.

Neste contexto, em 2004, um grupo de pesquisadores descreveu que um peptídeo antimicrobiano purificado de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) era capaz de reconhecer especificamente a GlcCer fúngica. A ligação do peptídeo na célula alvo leva a morte do patógeno, confirmando a potencial aplicação desse peptídeo como agente antifúngico e da GlcCer como potencial alvo para novas drogas antifúngicas (THEVISSSEN *et al.*, 2004). Maiores detalhes sobre a atividade e mecanismo de ação desse peptídeo serão discutidos adiante.

1.4- Peptídeos Antimicrobianos

Os organismos estão expostos diariamente a uma série de patógenos e para sua proteção neste ambiente hostil eles desenvolveram potentes mecanismos de defesa que são parte da imunidade inata e adaptativa. Nesse contexto se destaca a produção de substâncias antimicrobianas que são geralmente peptídeos ou polipeptídeos, denominados de peptídeos antimicrobianos (AMP). Os AMPs normalmente são pequenos (10 a 100 aminoácidos), positivamente carregados, anfipáticos e isolados de microrganismos unicelulares, insetos e outros invertebrados, plantas, anfíbios, pássaros, peixes e mamíferos (inclusive humanos) (JENSSEN, HAMILL & HANCOCK, 2006). Dependendo do organismo a expressão desses peptídeos pode ser constitutiva ou induzida. Essa indução pode ser causada por uma infecção e/ou um estímulo inflamatório, como por exemplo, a produção de uma citocina pró-inflamatória, a presença de uma bactéria ou de moléculas

bacterianas capazes de estimular a imunidade inata (JENSSEN, HAMILL & HANCOCOK, 2006). O fato da maioria dos AMPs serem catiônicos e apresentarem estruturas anfipáticas facilitam sua interação e inserção em paredes celulares aniônicas e membranas plasmáticas, que contém fosfolipídeos. Após a inserção na membrana, AMPs podem atuar perturbando a integridade física da bicamada lipídica, através da desestabilização da membrana, formação de poros e/ou distúrbio da função de barreira. Esses peptídeos podem, ainda, atravessar a membrana citoplasmática e agir em alvos internos (HANCOCOK & SAHL, 2006). Além dos efeitos diretos desses peptídeos nos microrganismos, eles também podem modular o sistema imune do hospedeiro (Figura 9) (HANCOCOK & DIAMOND, 2000).

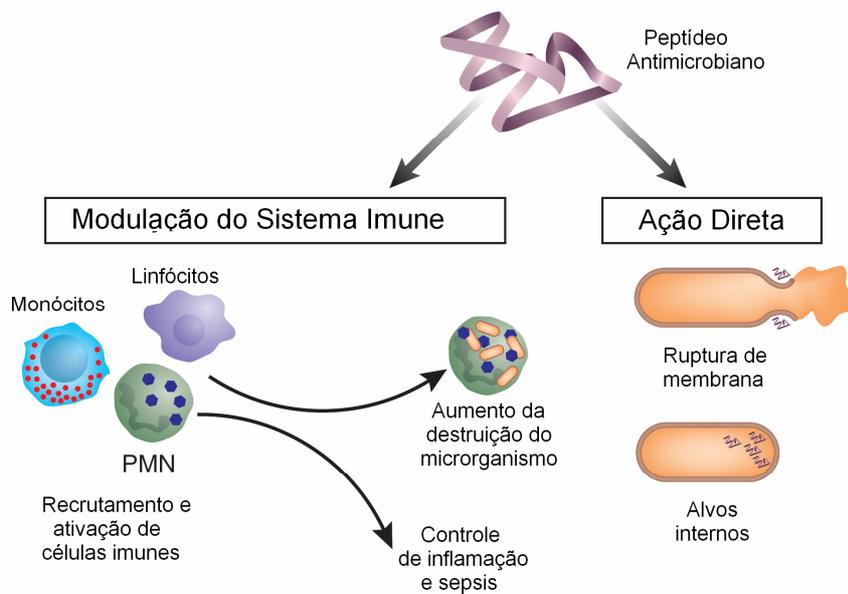


Figura 9: Mecanismos gerais propostos para ação de peptídeos antimicrobianos. Tanto ação direta com morte do microrganismo (por agir em alvos internos e/ou ruptura da membrana) como a modulação do sistema imune (via recrutamento e ativação de células imunes), podem ocorrer, apesar disso, alguns peptídeos apresentam uma ou outra ação preferencialmente (HANCOCOK & SAHL, 2000).

Diversos modelos foram propostos para explicar a permeabilização de membrana (Figura 10); no “modelo de barril” ocorre a permeabilização da membrana através da formação de pequenos poros (denominados de poros do “tipo barril”), onde as regiões hidrofóbicas do peptídeo alinham-se com a região do núcleo lipídico da bicamada e as regiões hidrofílicas formam o interior dos poros, que podem atuar como canais iônicos. No “modelo toroidal” a inserção dos peptídeos induz a membrana a dobrar continuamente através do poro denominado “toroidal” que apresenta diâmetros maiores que os poros descritos anteriormente. Em um terceiro modelo chamado de “tapete”, os peptídeos acumulam-se sobre a superfície da bicamada e a desmontam como uma ação detergente, resultando na desestruturação total da membrana plasmática e a formação de micelas a partir da membrana rompida (BROGDEN, 2005).

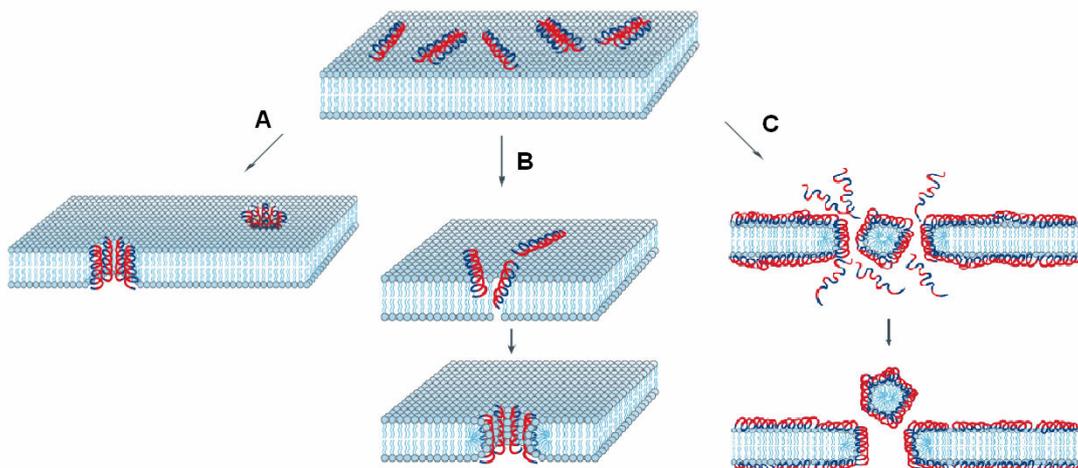


Figura 10: Modelos de mecanismos de permeabilização de membranas propostos para explicar a ação de peptídeos antimicrobianos. Modelo barril (A), modelo toroidal (B) e modelo tapete (C). Modificado de BROGDEN, 2005.

Foi proposto ainda que peptídeos que atravessam a membrana podem agir por outros mecanismos para levar a morte de microrganismos como: a inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de ácidos nucléicos, inibição da síntese de proteínas, inibição de atividade enzimática e até mesmo a alteração na formação de septo de membrana citoplasmática (BROGDEN, 2005).

Além disso, trabalhos recentes têm indicado que alguns peptídeos catiônicos são moduladores de imunidade inata, uma propriedade que pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BOWDISH, DAVIDSON & HANCOCK, 2005). Apresentam propriedades imunomoduladoras, como a regulação da expressão de centenas de genes em monócitos e células epiteliais, quimioatração de células imunes, indução de citocinas, a promoção da angiogênese e resolução de infecções (HANCOCK & SAHL, 2006).

Baseado na composição de aminoácidos e estrutura os AMPs podem ser dividido em outros subgrupos (Figura 11): (i) peptídeos aniônicos; (ii) peptídeos lineares catiônicos α -hélice (não possuindo resíduos de cisteína); (iii) peptídeos catiônicos e aniônicos enriquecidos em alguns aminoácidos específicos; (iv) peptídeos catiônicos e aniônicos que contém cisteína e formam ligações dissulfeto estabilizadas por folha β (v) peptídeos catiônicos e aniônicos resultados da fragmentação de grandes proteínas (BROGDEN, 2005).

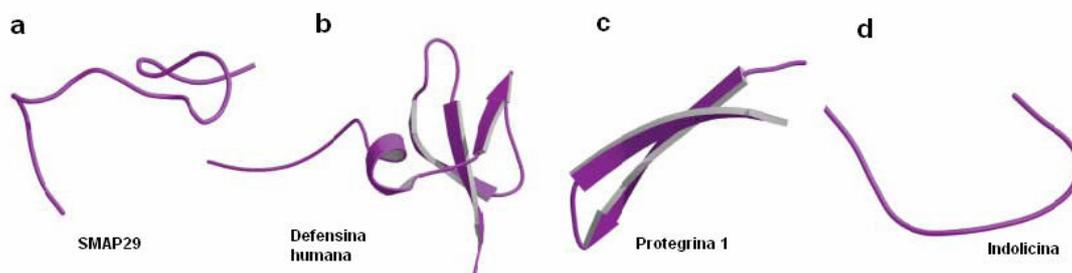


Figura 11: Exemplos de peptídeos antimicrobianos. (a) peptídeo linear e catiônico α -hélice, (b e c) peptídeos que contém resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto, (d) peptídeo enriquecido em aminoácido específico (modificado de BROGDEN, 2005).

Além dos peptídeos que serão citados neste trabalho, muitas outras moléculas estão em processo de descoberta, desenvolvimento e ensaios clínicos. O desenvolvimento de um medicamento é um processo longo, trabalhoso e de custo bastante elevado. Em geral, de 5.000 a 10.000 moléculas que são identificadas com potencial terapêutico, somente 250 chegam à fase de investigação pré-clínica. Dessas, apenas 5 serão estudadas em seres humanos e só uma delas chegará ao mercado, após aprovação e registro para uso terapêutico. Esse processo tem duração de aproximadamente 10 anos e custo em torno de 2 bilhões de reais (PhRMA, 2007).

Os peptídeos catiônicos têm enorme diversidade, uma impressionante variedade de atividades e tem prestado um enorme impulso ao desenvolvimento de novos peptídeos sintéticos. Até o momento, apenas quatro peptídeos ou proteínas catiônicas estão em avançados ensaios clínicos de fase 3, que é realizado com um maior número de indivíduos e onde avalia-se principalmente a eficácia comparada do medicamento com o tratamento de referência (HANCOCK & SAHL, 2006). Esses peptídeos têm origens e indicações variadas: ○ Pexiganan (derivado da magainina que é extraída da pele do sapo *Xenopus laevis*) é indicado para o tratamento e prevenção do impetigo e úlceras de pé em pacientes diabéticos, o Iseganan (derivado sintético de uma protegrina encontrada em leucócitos de porco) para mucosite oral, o Neuprex (derivado da proteína bactericida que aumenta a permeabilidade de origem humana) para septicemia e o Omiganan (análogo sintético de uma indolicina purificada de neutrófilos bovinos) é indicado para infecções associadas a cateter (GORDON, ROMANOWSKI & McDERMOTT, 2005; HANCOCK E SAHL, 2006). Mesmo assim, apesar de duas décadas de esforços, o sucesso na clínica ainda é limitado.

A crescente dificuldade para aprovação de novas drogas pode ser atribuída, entre outros fatores, ao fato das agências reguladoras terem aumentado o rigor para registro de um novo medicamento, o aumento do número de testes pré-clínicos exigidos e o aumento do número de participantes necessários para os estudos clínicos.

1.5- Defensinas

Dentro do grupo de peptídeos catiônicos e aniônicos que contém cisteína e formam ligações dissulfeto estabilizadas por folha β encontramos um específico formado pelas defensinas, que serão exploradas em maiores detalhes nessa Dissertação. Essas moléculas vêm sendo isoladas em organismos que incluem invertebrados, plantas e animais (incluindo humanos). Fazem parte do sistema imune inato, como uma antiga estratégia de organismos multicelulares para o controle de sua microbiota normal ou o combate a microrganismos patogênicos (THEVISSSEN *et al.*, 2007). As defensinas consistem em uma família

de AMPs produzidos por eucariotos sendo normalmente formadas por peptídeos pequenos de aproximadamente 5 kDa, básicos e ricos em cisteína. Apresentam estrutura tridimensional comum que consiste de fitas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice, estabilizadas por pontes disulfeto (Figura 12) (AERTS *et al.*, 2008).

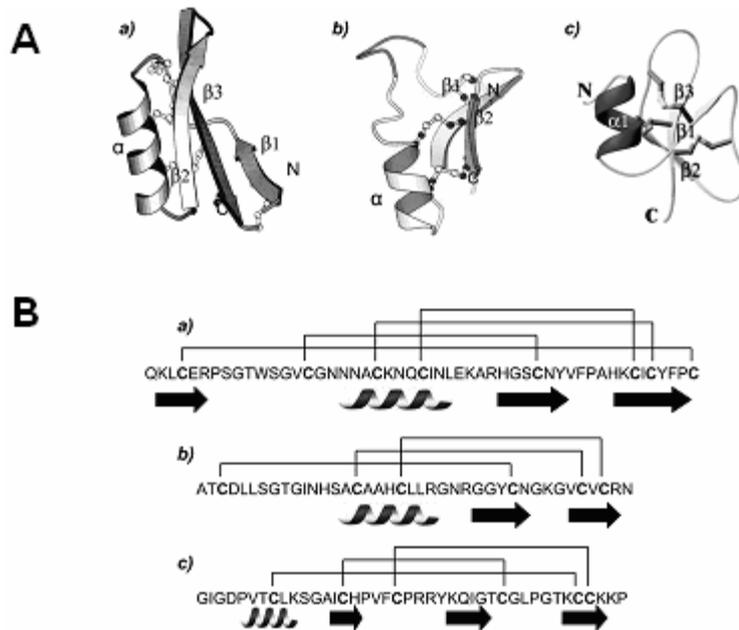


Figura 12: (A) Estrutura tri-dimensional e (B) seqüência primária com linhas de conexão (representando pontes disulfeto) entre os resíduos de cisteína de: (a) RsAFP1 de planta, (b) Defensina A de inseto e (c) HBD2 de humano (c). Os símbolos representam as posições das α -hélices (espiral) e folhas β (setas) (AERTS *et al.*, 2008).

Além disso, foi postulado que todas as defensinas tenham evoluído de um único precursor, baseado na homologia de suas seqüências (AERTS *et al.*, 2008). O mecanismo de ação das defensinas não está bem definido, mas essa classe de AMP também leva a permeabilização de membranas contendo fosfolipídeos (BROGDEN, 2005). Adicionalmente, a indução de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi sugerida como um passo crucial no mecanismo antifúngico de vários peptídeos antimicrobianos (JENSSEN, HAMILL & HANCOCOK, 2006).

Até agora apenas um pequeno número de defensinas de plantas apresentaram atividade antibacteriana (AERTS *et al.*, 2008). Por outro lado, defensinas de planta apresentam potente atividade antifúngica contra uma

ampla variedade de fungos fitopatogênicos, além de inibir também fungos patogênicos ao homem (tais como *C. albicans*) em baixas concentrações (1-100 μ M). Diversos experimentos vêm confirmando o papel das defensinas na defesa contra fungos fitopatogênicos. Os dados da literatura sugerem que alguns peptídeos encontrados nas sementes exercem seu papel protetor durante os primeiros estágios de germinação, embora sejam também encontrados em outros tecidos mais desenvolvidos, como frutas e flores (THEVISSSEN *et al.*, 2003).

Diferente da maioria dos peptídeos antimicrobianos, que atuam de forma inespecífica ao interagir com fosfolipídeos da membrana plasmática, a atividade microbicida de defensinas isoladas de plantas parece envolver uma etapa de reconhecimento molecular. Isso teria como consequência um mecanismo de sinalização que resulta na permeabilização da membrana (THEVISSSEN *et al.*, 2005). Sugere-se ainda que a indução de morte pode ocorrer também através de interação com DNA, RNA, proteínas, alteração na síntese de proteínas ou até mesmo inibição de canais iônicos. Entretanto, não está clara a capacidade de defensinas de planta serem internalizadas após interagir com esfingolipídeos para então atingir alvos internos ainda não está esclarecida (THEVISSSEN *et al.*, 2005).

Conforme citado anteriormente, algumas defensinas apresentam como alvo GSL fúngicos. A defensina de planta DmAMP1, isolada de *Dahlia merckii*, interage com o GLS fúngico M(PI)₂C, inibindo o crescimento de *S. cerevisiae* em doses inferiores a 100 μ g/ml e em doses superiores levam a permeabilização de membrana de forma específica, uma vez que mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na biossíntese desse GSL são resistentes (AERTS *et al.*, 2008). Além disso, mutantes de *S. cerevisiae* com maior teor de M(PI)₂C em suas membranas apresentam hipersensibilidade à DmAMP1, demonstrando uma ligação direta entre a quantidade de M(PI)₂C e a sensibilidade a DmAMP1 (AERTS *et al.*, 2008). Uma outra defensina, denominada de MsDef1, extraída de semente de alfafa (*Mendicago sativa*) inibe o alongamento de hifas no fungo patogênico *F. graminearum* (AERTS *et al.*, 2008). O fato de que mutantes de *F. graminearum* deficientes na síntese de GlcCer resistem à ação de MsDef1 sugere que esse peptídeo também tem como alvo a GlcCer (AERTS *et al.*, 2008).

1.6- Proteína antifúngica isolada de *Raphanus sativus* (“*Raphanus sativus* antifungal protein” - RsAFPs)

A RsAFPs é uma defensina antifúngica encontrada em sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) (TERRAS *et al.*, 1992) (Figura 13). Esse peptídeo ocorre predominantemente nas camadas de células mais externas dos diferentes revestimentos desta semente. Assim podem ser preferencialmente liberados durante a germinação após a abertura da capa da semente (TERRAS *et al.*, 1995).

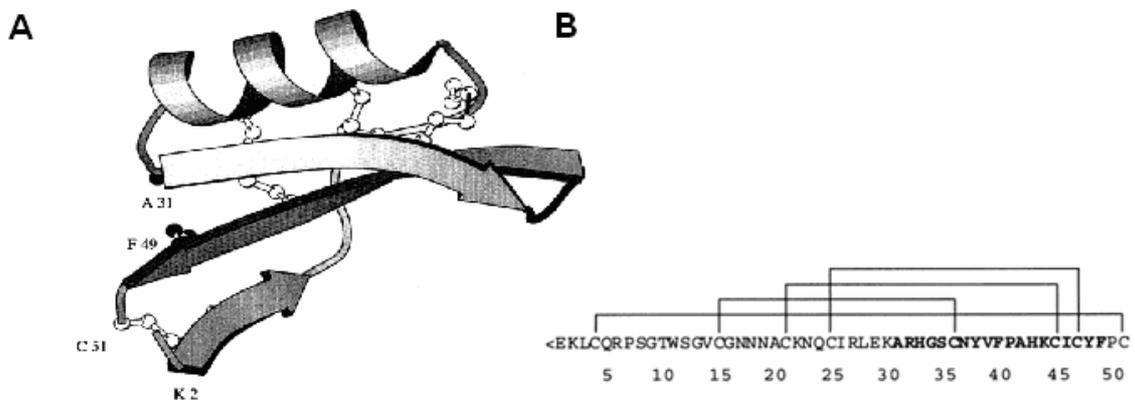


Figura 13: Estrutura em 3D (A) e seqüência primária de RsAFP2 (B) (adaptado de SCHAAPER *et al.*, 2000).

Estudos conduzidos por Thevisen e colaboradores demonstraram que a defensina RsAFP2 interage especificamente com GlcCer fúngico, apresentando uma potente atividade contra *C. albicans*, *Pichia pastoris* e *Neurospora crassa* em concentrações menores do que 5 μ M. Porém, o espectro de ação da RsAFP2 frente a diferentes espécies fúngicas *in vitro* bem como sua atividade em modelos *in vivo* ainda não foi descrito (THEVISSEN *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que fungos que não produzem GlcCer são intrinsecamente mais resistentes ao peptídeo. Por exemplo, a levedura *S. cerevisiae* não produz esse glicolípido e requer uma concentração 20 vezes maior da defensina RsAFP2 para ser morto, sugerindo que mecanismos distintos possam ser utilizados por esse peptídeo, de acordo com a concentração disponível (THEVISSEN *et al.*, 2004).

Avaliando o mecanismo de ação da RsAFP2 foi observado que esse peptídeo não faz poros permeáveis a íons, nem altera diretamente as propriedades elétricas de membranas artificiais indicando, possivelmente, um mecanismo mediado por um receptor. Experimentos subseqüentes revelaram que a incubação de *C. albicans* com RsAFP2 promove um aumento significativo na produção de ROS pelo fungo (AERTS *et al.*, 2007). Essa produção foi correlacionada com a morte do fungo, uma vez que a adição de antioxidantes no meio diminuiu a detecção de ROS e tornou o fungo resistente ao peptídeo (AERTS *et al.*, 2007). Isso levou a uma proposta de um modelo de mecanismo de ação da RsAFP2 (Figura 14), no qual a RsAFP2 interagiria com GlcCer na membrana plasmática dos fungos, fato que levaria a produção de radicais derivados de oxigênio, permeabilização celular e morte do microrganismo (AERTS *et al.*, 2007).

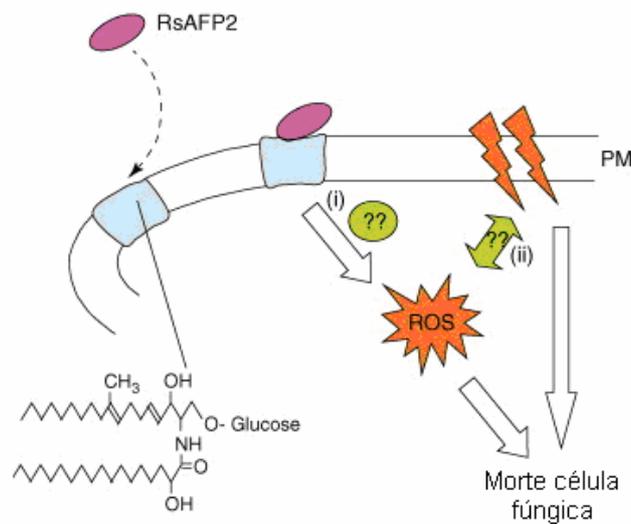


Figura 14: Modelo de ação da defensina RsAFP2 proposto por THEVISSEN e colaboradores (2007). RsAFP2 (rosa) interage com GlcCer (azul) na membrana plasmática de fungos susceptíveis. Depois dessa interação ocorre permeabilização de membrana que leva a morte fúngica. Adicionalmente, RsAFP2 induz a produção de ROS depois da interação inicial com GlcCer. Porém ainda não está esclarecido (i) como ROS é gerado e (ii) se existe uma correlação entre a produção de ROS e a permeabilização de membrana.

Embora a produção de ROS seja clara, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não está esclarecido (Figura 14 – i), bem como se existe uma correlação entre a produção de ROS e a permeabilização de membrana (Figura 14 – ii) (THEVISSSEN *et al.*, 2007). Esses radicais, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, são produzidos como subprodutos da respiração aeróbia e causam dano a proteínas, lipídios e DNA, resultando em mutação e à perda de viabilidade celular. Diferentes antifúngicos como miconazol e anfotericina B têm a capacidade de indução de ROS em fungos suscetíveis e, além disso, células em processo de apoptose exibem vários marcadores característicos incluindo a produção endógena desses radicais (AERTS *et al.*, 2007). Da mesma forma que as GlcCer são enriquecidas em domínios lipídicos de células animais espera-se que o mesmo ocorra nas membranas fúngicas. Uma vez que esses domínios estão normalmente associados com proteínas sinalizadoras, pode-se imaginar que a ligação da RsAFP2 na membrana ative essas plataformas e isso desencadeie um mecanismo de sinalização intracelular que culmina com a produção de ROS e na morte fúngica. Essa possibilidade precisa ser investigada em maiores detalhes. Porém, o enriquecimento da GlcCer na parede celular dos fungos seria o primeiro impedimento para a chegada desses peptídeos na membrana plasmática (RODRIGUES *et al.*, 2000).

A utilização de defensinas *in vivo* é uma alternativa em potencial, mas requer estudos mais refinados envolvendo modelos *in vitro* e principalmente, modelos animais. Além disso, o exato mecanismo de ação para alguma dessas defensinas, onde destacam-se àquelas isoladas de plantas, também permanece em questão.

2- Objetivos:

Avaliar o uso da RsAFP2 (defensina ligante de GlcCer) como potencial estratégia anti-fúngica. Diante das informações discutidas anteriormente, as metas seguintes foram traçadas:

- i. Avaliar o efeito antifúngico da defensina RsAFP2 frente a diferentes espécies do gênero *Candida* capazes ou não de sintetizar GlcCer;
- ii. Caracterizar as alterações morfológicas em leveduras de *Candida* tratadas com o peptídeo;
- iii. Avaliar o sítio celular de ligação da defensina RsAFP2;
- iv. Avaliar a toxicidade da RsAFP2 frente a células animais.
- v. Testar a capacidade antifúngica desse agente em modelos experimentais *in vivo*.

3- Materiais e Métodos

3.1 Cultivo de células fúngicas e animais:

- **Células fúngicas:** As espécies de *Candida*, listadas na Tabela 2, foram cultivadas em meio PDB /YPD [24 g/ L de PDB (caldo de batata – dextrose) - Difco; 2 g/ L de extrato de levedura, Difco; 4 g/ L peptona, Difco; 4 g/ L glucose) suplementado com 50 mM HEPES, pH 7,0], conforme descrito previamente (THEVISSSEN *et al.*, 2004). As culturas foram incubadas por 48h à temperatura ambiente. As células foram então coletadas por centrifugação e lavadas em PBS (NaCl 137 mM, K₂HPO₄ 10mM, KCl 2,7 mM, pH 7,2) para uso nos experimentos descritos a seguir.

Tabela 2: Relação de espécies de *Candida* e seus respectivos isolados utilizados

Espécie	Designação	Origem
<i>C. albicans</i>	12A	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	2A	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	78	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	9	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	11	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	44A	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	44B	Prof. Sergio Fracalanza (IMPPG – UFRJ)
	ATCC 36802	Prof. Daniela S. Alviano (IMPPG – UFRJ)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Prof. Daniela S. Alviano (IMPPG – UFRJ)
	H234	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	B402	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	HE07	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	40038	Dra. Lucimar Ferreira Kneipp (Fiocruz)
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	Prof. Daniela S. Alviano (IMPPG – UFRJ)
	H79	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	P92	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
	0506	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
	50148	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
<i>C. tropicalis</i>	0506	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
	H99	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	H47	Prof. Tyiome Aikiti (HUCFF – UFRJ)
	40096	Dra. Lucimar Ferreira Kneipp (Fiocruz)
	54170	Dra. Lucimar Ferreira Kneipp (Fiocruz)
<i>C. glabrata</i>	121	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
	24	Prof. Allen Norton Hagler (IMPPG – UFRJ)
	40136	Dra. Lucimar Ferreira Kneipp (Fiocruz)
	Cavidade Oral	Prof. Daniela S. Alviano (IMPPG – UFRJ)
<i>C. dublinensis</i>	Cavidade Oral	Prof. Daniela S. Alviano (IMPPG – UFRJ)

- **Células animais:** As células endoteliais de cérebro humano (HBMEC) foram cultivadas em M199 suplementado com 20% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e glutamina 2mM. As linhagens de glioma humano (U87) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e glutamina 2mM. As células foram mantidas em garrafas de 25 cm² e transferidas para placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro ou placas de 96 poços para os ensaios descritos adiante.

3.2 Atividade antifúngica da defensina RsAFP2 *in vitro*

A defensina RsAFP2, purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), originária de semente de rabanete foi gentilmente cedida pela Doutora Karin Thevissen (Centre of Microbial and Plant Genetics, Katholieke Universiteit Leuven Belgium) para serem utilizadas em nossos estudos. As células fúngicas (10³ células) de cada espécie foram incubadas por 18 horas em 100 µL de meio PDB/YPD à temperatura ambiente na ausência e na presença de RsAFP2 em diferentes concentrações (0,6 - 10 µM). As células fúngicas foram lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas em 1 mL de meio PDB /YPD. Aliquotas de 20 µL foram misturadas com 80 µL de meio PDB /YPD e então inoculadas em placas contendo meio Sabouraud sólido. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas após 2 dias de incubação a 28°C. O número de UFC foi comparado com as espécies de *Candida* não tratadas sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos como porcentual de células viáveis, usando células não tratadas como referência. (THEVISSSEN *et al.*, 2004)

3.3 Avaliação da relação entre quantidade de GlcCer e sensibilidade à defensina RsAFP2 por extração e purificação de GlcCer

- **Extração de GlcCer fúngica:** Para obtenção dos lipídeos neutros os fungos crescidos em PDB/YPD (10⁸ - 10¹⁰ leveduras) foram lavados 3 vezes com PBS e extraídos sequencialmente com misturas de clorofórmio-metanol 2:1 e 1:2 (v/v) por 2 h, sob agitação. Os extratos foram posteriormente submetidos à partição de acordo com o método de Folch (FOLCH, LEES & STANLEY; 1957). A

fase inferior, enriquecida em lipídeos neutros, foi normalizada de acordo com o peso de lipídeo bruto e, posteriormente, analisada por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) conforme detalhado (SCHNAAR, 1994a).

- **Visualização da GlcCer por HPTLC:** Para detecção de CMH o extrato lipídico foi resolvido no sistema solvente composto por C:M:H (clorofórmio-metano-água) 65:25:4 e as bandas visualizadas após utilização do reagente orcinol-sulfúrico e aquecimento a 125⁰C por 5 min. Foi utilizado um padrão de GlcCer fúngico previamente purificado em nosso laboratório. A partir das bandas resolvidas por HPTLC, análises de densitometria foram realizadas para determinar a quantidade relativa de CMH utilizando-se o programa “Scion (NIH image – Scion Corporation)” (SCHNAAR, 1994b).

3.4 Efeito da defensina RsAFP2 sobre a morfologia fúngica

Possíveis alterações morfológicas decorrentes do tratamento com RsAFP2 foram avaliadas por microscopia eletrônica. Os fungos (10⁵ células) tratados ou não com a defensina foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso as células fúngicas foram lavadas com PBS e fixadas em uma solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M durante 30 min. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, pós-fixadas com OsO₄ por 40 min à temperatura ambiente e desidratadas em soluções de acetona, sendo em seguida incluídas em Epon. O material foi observado em um microscópio de transmissão Zeiss 900. Este experimento foi realizado com a colaboração da Professora Dr. Sonia Rozental (FRANZEN *et al.*, 2006).

3.5 Determinação do sítio de interação da defensina RsAFP2 na superfície fúngica

As células fúngicas foram lavadas com PBS e incubadas com RsAFP2 durante 2 h. Após o período de incubação, as leveduras foram lavadas com PBS

e, em seguida, fixadas com paraformaldeído a 4%. As células foram então lavadas com PBS e incubadas por 1h com PBS-BSA 1% para bloqueio de ligações inespecíficas, seguido de um tratamento de 12 h a 4°C com anticorpo policlonal anti-RsAFP2 (obtido de soro de coelho imunizado com RsAFP2, gentilmente cedido pela Dr. Karin Thevissen). Para reduzir a possibilidade de ligações não específicas do anticorpo de coelho com *C. albicans* (cepa 78), a preparação do soro foi incubada com 10^7 leveduras de *C. albicans* (cepa 78) fixadas em paraformaldeído por 2 h à temperatura ambiente, antes da exposição as células tratadas com o peptídeo. Foi utilizado um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (na diluição de 1:500 por 2 h). Finalmente, para visualização da membrana citoplasmática fúngica foi utilizada a marcação com uma solução de 5 µg/ml filipina III (extraída de *Streptomyces filipinensis* – Sigma) por 15 min (WACHTLER & BALASURAMANIAN; 2006). A filipina interage com esterol em plataformas lipídicas e, por essa razão, é utilizada como marcadora dessas regiões da membrana. As células foram novamente lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera digital Color View SX. As imagens foram processadas através do uso do programa AnalySIS (Soft Image System).

3.6 Ensaio da lactato-desidrogenase para determinação de toxicidade da defensina RsAFP2 em células hospedeiras

As células HBMEC e U87 foram cultivadas em placas de 96 poços com 200 µL de meio de cultura e incubadas por 18 h com RsAFP2 na concentração de 10 µM. O sobrenadante desse tratamento foi homogeneizado cuidadosamente, centrifugado e alíquotas de 80 µL foram transferidas para uma outra placa de 96 poços. A seguir foram adicionados 120µl de uma solução contendo piruvato (0,5 µg/mL em PBS) e NADH (0,5 µg/mL em PBS) ao sobrenadante alíquotado e o consumo de NADH após 1 h de reação medido pela diminuição de leitura no comprimento de onda de 340 nm em leitor de ELISA (COLLINS, YANG & SCHANAAR, 2000).

3.7 Efeito do pré-tratamento com soro na atividade antifúngica de RsAFP2

Para avaliar a resistência de RsAFP2 a peptidases presente no soro, a defensina foi incubada em 100 µl de meio YPD/PDB suplementado com 10, 20 ou 50% de soro fetal bovino (SFB) na concentração final de 10 µ M. Após 2 h de tratamento a 37°C, 10³ células de *C. albicans* foram adicionadas e incubadas por 12 h à temperatura ambiente. Como controle positivo, o AMP gomesina sensível a peptidases (1µM) foi incubado e teve sua atividade testada sob as mesmas condições.

3.8 Testes de efeito antimicrobiano em camundongos - modelo *in vivo*

Cada camundongo (seis semanas de idade) Balb/c macho (n=5) foi inoculado, pela via intravenosa, com 2x10⁵ leveduras de *C. albicans* (isolado 78), suspensas em 50 µL de salina estéril (0,85% de NaCl). A defensina RsAFP2 foi injetada por via intravenosa (7 ou 14 mg/Kg do animal administrado em 50 µl de salina) 1 h antes (Figura 15A) ou 1 h depois (Figura 15B) da infecção por *C. albicans*. Os animais foram tratados novamente a cada 24 h com a mesma quantidade de defensina por mais 3 dias. Os camundongos controle foram injetados com o mesmo volume de solução salina, seguindo o mesmo protocolo. Alternativamente, camundongos foram tratados com 10 mg/Kg de fluconazol seguindo o mesmo protocolo descrito para RsAFP2. Após 24 horas da última injeção de defensina os animais foram sacrificados, o rim foi removido, pesado, homogeneizado e lavado 3 vezes em PBS. O decantado correspondente foi ressuspenso e homogeneizado em 1 mL de PBS. A seguir, 100 µL desta suspensão foi plaqueada em meio Sabouraud sólido e incubada a 37°C por 2 dias para contagem de UFC. Este experimento foi realizado com a colaboração do Professor Dr. Carlos Taborda (USP) (CLEMONS & STEVENS, 2001).

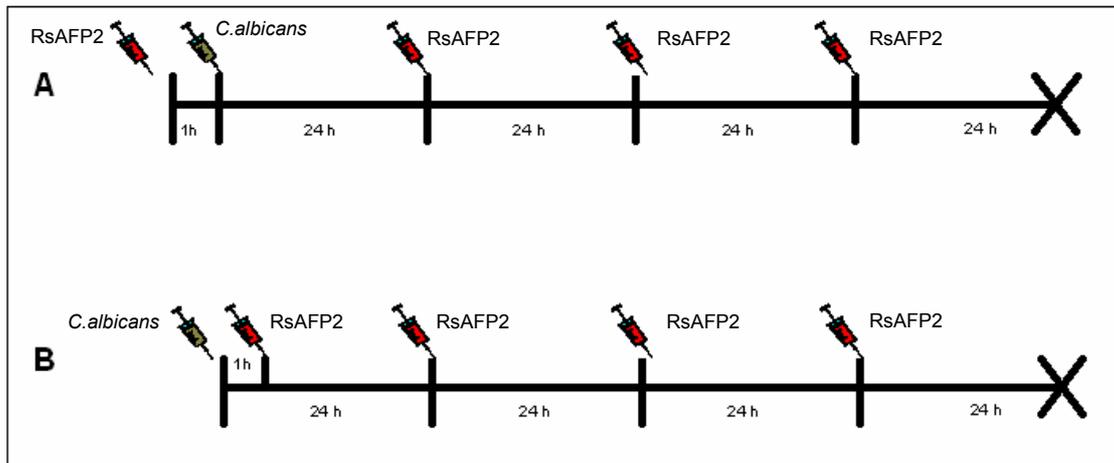


Figura 15: Esquema do modelo de candidíase experimental. Em (A), a defesa RsAFP2 foi injetada por via intravenosa (7 ou 14 mg/Kg do animal, administrado em 50 μ L de salina) 1 h antes da infecção por *C. albicans*. Os animais foram tratados mais 3 vezes a cada 24 h após a infecção com a mesma quantidade de defesa e sacrificados 24 h após o último tratamento com RsAFP2. Em B a defesa RsAFP2 foi injetada por via intravenosa (7 ou 14 mg/Kg do animal, administrado em 50 μ L de salina) 1 h depois da infecção por *C. albicans*. Os animais foram tratados mais 3 vezes a cada 24 h após a infecção com a mesma quantidade de defesa e sacrificados 24 h após o último tratamento com RsAFP2.

3.9 Análises Estatísticas:

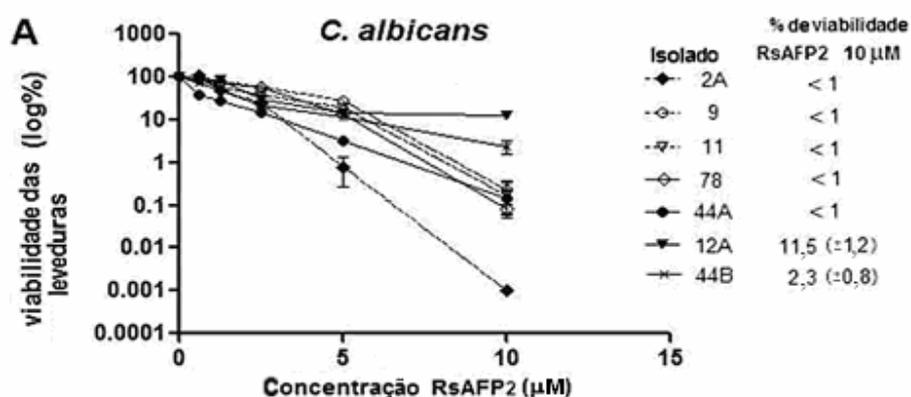
O teste *t*-Students foi usado para comparar as diferenças entre os grupos.

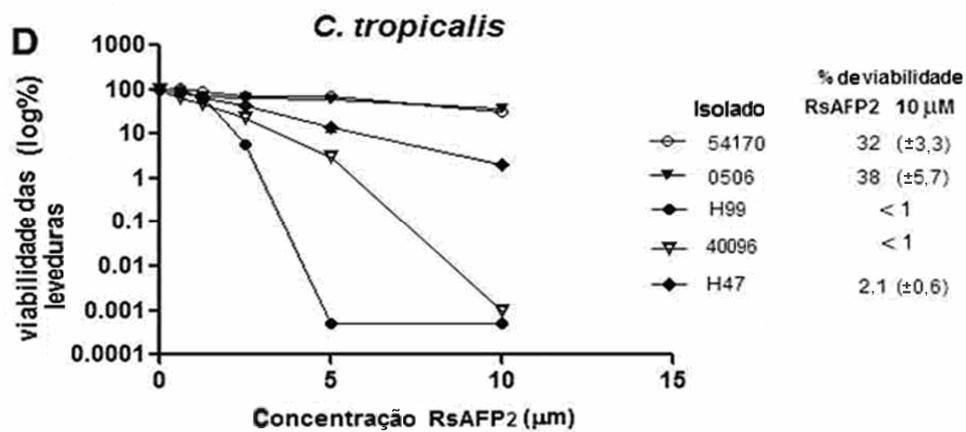
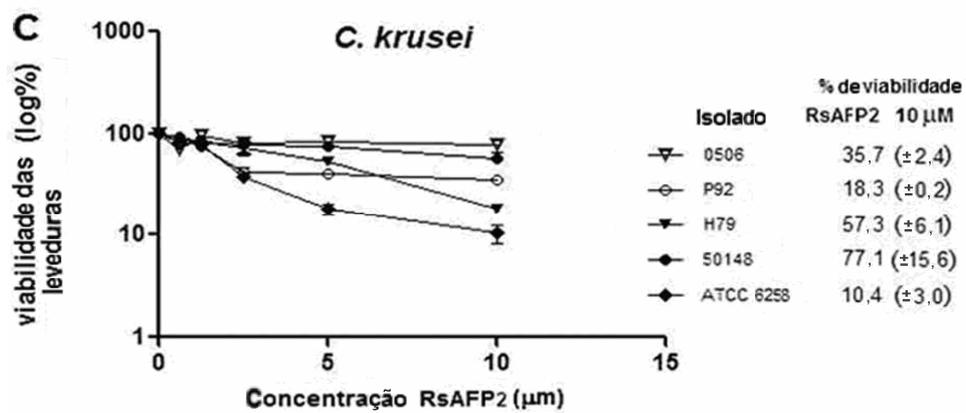
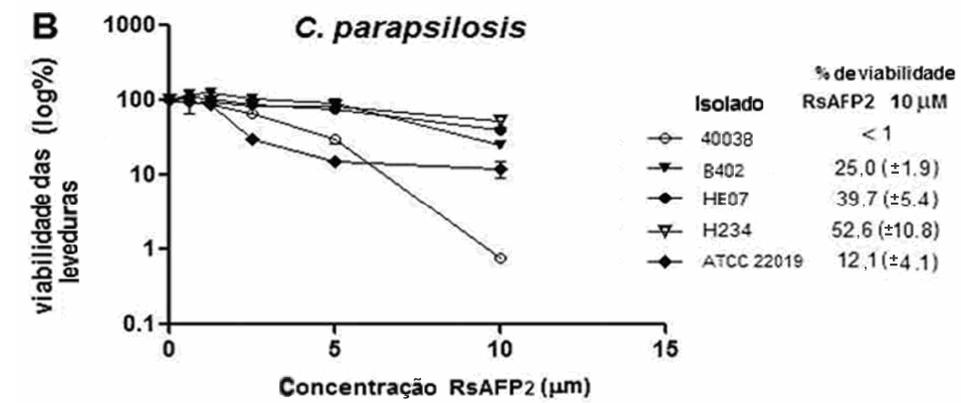
4. Resultados:

4.1 Avaliação do efeito *in vitro* da defensina RsAFP2 frente a diferentes espécies e isolados do gênero *Candida*

A atividade antifúngica da defensina RsAFP2 foi testada frente a diferentes espécies e isolados de *Candida*, conforme demonstrado na Figura 16. Nossos dados mostraram que os diferentes isolados de *C. albicans* testados foram susceptíveis a RsAFP2, sendo o efeito dependente da dose utilizada (Figura 16A). No entanto, observamos uma diferença significativa no perfil de susceptibilidade de algumas cepas. O isolado *C. albicans* 2A foi o que se mostrou mais susceptível ao tratamento com RsAFP2, enquanto a cepa 12A foi a mais resistente, embora tenhamos observado uma redução de aproximadamente 89% em sua viabilidade na maior concentração usada de RsAFP2 (Figura 16A).

Adicionalmente, isolados de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. parapsilosis* (Figura 16 B, C, D e E) foram também testados e se mostraram susceptíveis ao tratamento com RsAFP2. No entanto, não observamos a mesma eficiência demonstrada para as cepas de *C. albicans*. Dentre as espécies testadas nossos dados sugerem que a *C.krusei* e *C. parapsilosis* são as mais resistentes à ação da RsAFP2. Além disso, observamos que os isolados de *C. glabrata* não foram susceptíveis ao tratamento com RsAFP2, pois mantiveram a sua viabilidade comparável ao controle mesmo na dose de 10 μ M, maior concentração de defensina utilizada nos ensaios (Figura 16F).





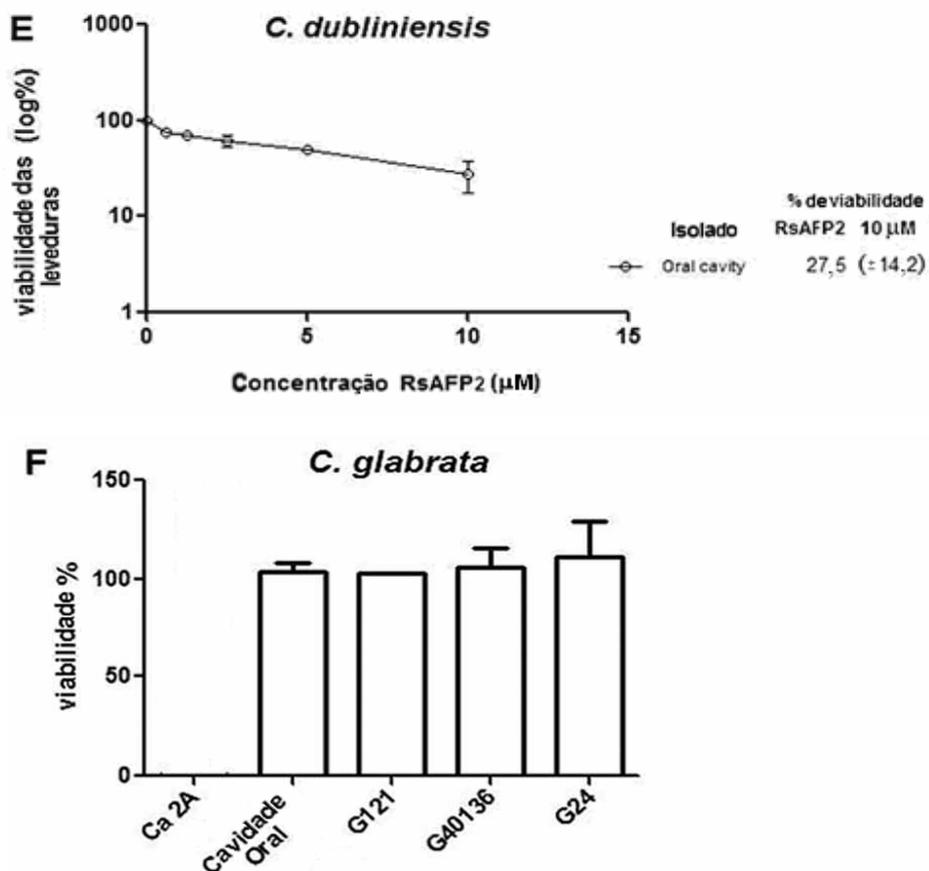


Figura 16: Avaliação do percentual de viabilidade de diferentes espécies de *Candida* (A ao F) frente a concentrações variadas de defensina. As leveduras foram tratados por 12 h com diferentes concentrações de RsAFP2 (0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM e 10 μM). Isolados de *C. glabrata* foram tratados somente com 10 μM de RsAFP2 e *C. albicans* (2A) utilizada como controle (F). Valores máximos de viabilidade (100%) foram obtidos das contagens de CFU dos isolados tratados com PBS.

4.2 Correlação entre a expressão de GlcCer em *C. albicans* e o efeito antimicrobiano da defensina RsAFP2

A diferença na susceptibilidade dentro de uma mesma espécie e a ausência de inibição de crescimento em isolados de *C. glabrata* nos levou a análise do perfil de expressão de GlcCer. Assim, investigamos a quantidade de GlcCer em *C. albicans* isolados 2A, 78 e 12A, que apresentaram respectivamente susceptibilidade alta, moderada e fraca frente a RsAFP2. A presença de GlcCer foi também avaliada em um isolado de *C. glabrata* com o

objetivo de confirmar a ausência do mesmo. Nossos resultados mostraram bandas orcinol-positivas nos extratos de todas as *C. albicans* testadas (Figura 17A). Essas bandas apresentaram fator de retenção (R(f)) correspondente ao padrão de GlcCer fúngica. Como esperado, nenhuma banda correspondente a GlcCer foi encontrada em *C. glabrata*, fato que explica sua resistência à defensina (Figura 17A). A análise por densitometria das bandas referentes à GlcCer das diferentes cepas revelou que a quantidade de GlcCer presente na levedura foi diretamente proporcional a sua susceptibilidade frente a defensina RsAFP2 (Figura 17B).

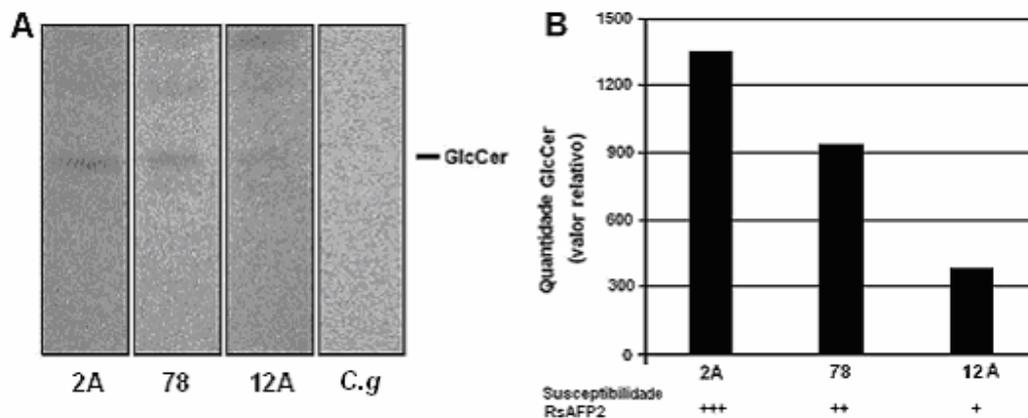


Figura 17: Correlação entre quantidade de GlcCer na superfície fúngica e o efeito antimicrobiano da defensina RsAFP2. (A) A expressão de CMH de três diferentes isolados de *C. albicans* (cepa 2A, cepa 78 e cepa 12A) e uma *C. glabrata* (Cavidade oral). A GlcCer foi extraída com solventes orgânicos e analisado por cromatografia em camada fina (A). Análise de densitometria da figura A foi realizada utilizando o programa Scion (B) (+++ indica maior susceptibilidade; ++, susceptibilidade intermediária; +, menor susceptibilidade).

4.3 Alterações morfológicas provocados pela RsAFP2 em diferentes espécies de *Candida*.

O efeito antifúngico de RsAFP2 demonstrado na Figura 16 nos levou a analisar as possíveis mudanças morfológicas causadas pela defensina em diferentes espécies de *Candida*. Assim, três espécies diferentes foram tratadas com o peptídeo, *C. albicans* (ATCC36802), *C. krusei* (ATCC6258) e *C. parapsilosis* (ATCC22019) por 18 h na concentração de 10 μ M e as amostras foram preparadas para observação por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 18). As células não tratadas com o peptídeo (A, D e G da Figura 18) apresentaram morfologia normal, incluindo integridade da parede celular e eletron densidade citoplasmática uniforme. Por outro lado, as leveduras tratadas com o peptídeo apresentaram clara vacuolização (asteriscos em B, F e I), deformidade celular (B, E, H e I), descontinuidade de parede celular (B e H) e rarefação de citoplasma (C e F).

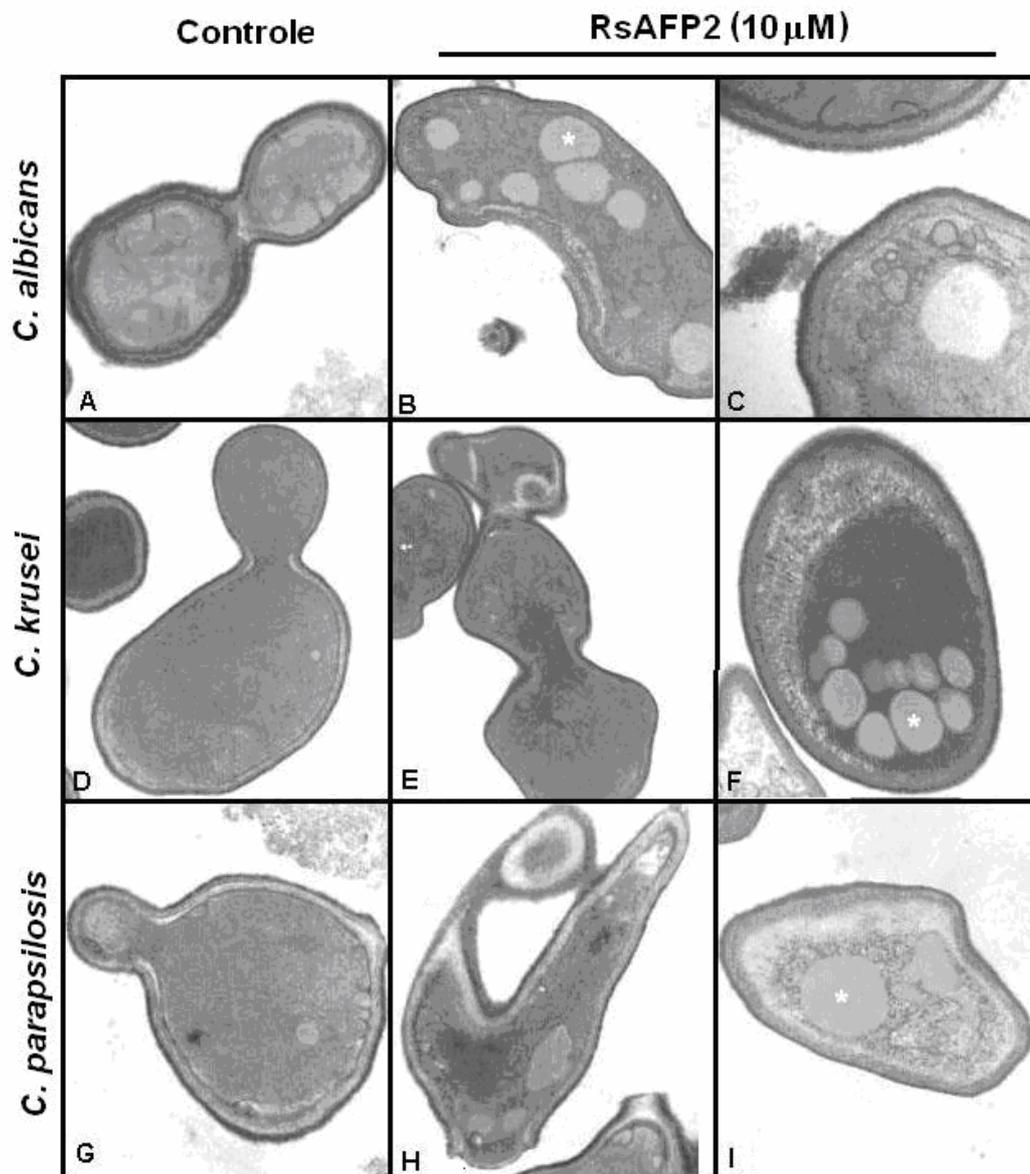


Figura 18: Análise de espécies de *Candida* tratadas com RsAFP2 por microscopia eletrônica de transmissão. As leveduras *C. albicans* ATCCA12 (B e C), *C. krusei* ATCC6258 (E e F) e *C. parapsilosis* ATCC22019 (H e I) foram tratadas com a defensina RsAFP2 (10 μ M) por 12 h e preparadas para observação em microscópio de transmissão. Controle (não tratadas com RsAFP2) leveduras de *C. albicans* (A), *C. krusei* (D) e *C. parapsilosis* (G).

4.4 Localização da ligação de RsAFP2 na superfície fúngica

A GlcCer está presente em diferentes regiões das leveduras, como parede e membrana celular. Dados do nosso laboratório revelam que em *C. neoformans* cerca de 75% da GlcCer se encontra na parede celular e o restante está distribuído pelas membranas (DUARTE *et al.*, manuscrito em preparação). No entanto, o exato sítio de ligação da RsAFP2 na superfície fúngica ainda não foi descrito. Com o objetivo de determinar a região de ligação da RsAFP2 na superfície fúngica incubamos o peptídeo com leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* e tratamos, em seguida, com soro anti-RsAFP2. Conforme sugerido por Thevissen e colaboradores (2004), a RsAFP2 se liga a superfície fúngica (Figura 19) em um processo que depende da expressão de GlcCer, visto que marcações em *C. glabrata* não apresentaram reações de fluorescência (dado não mostrado).

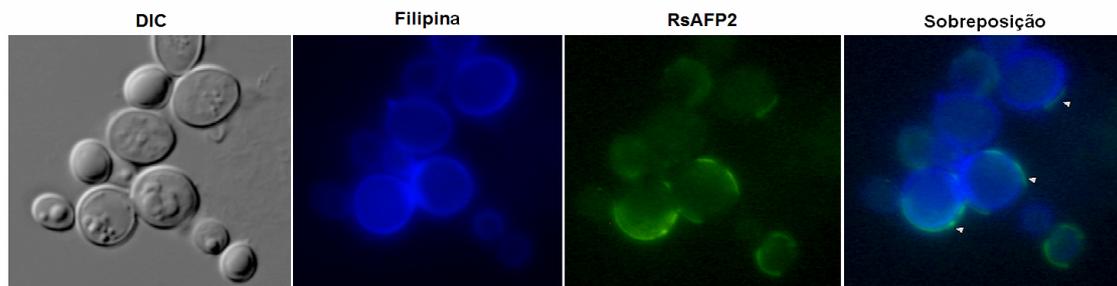


Figura 19: Avaliação da localização da ligação de RsAFP2 na superfície fúngica. *C. albicans* (78) foram tratadas (2 h) com RsAFP2, incubadas com filipina (azul) e anti-RsAFP2 (verde) e posteriormente com anti-coelho FITC. A intensidade da reação foi maior em algumas regiões mais externas das células (setas). *C. albicans* que não foram tratadas com RsAFP2 e *C. glabrata* tratadas com RsAFP2 seguidas de incubação com anti-RsAFP2 e anti-coelho FITC não apresentaram reação de fluorescência (dado não mostrado).

Esta observação reforça a especificidade da RsAFP2 sob as condições experimentais utilizadas neste estudo. Em algumas leveduras a reatividade do anticorpo anti-RsAFP2 ocorre em toda a superfície, embora a intensidade de reação não tenha sido uniformemente distribuída (setas na Figura 19). No entanto, na maioria das células a marcação para RsAFP2 foi visualizada apenas em alguns pontos da superfície da levedura. Ao contrário do que foi sugerido

anteriormente não observamos uma forte marcação na membrana plasmática, uma vez que não houve co-localização da reatividade dos anticorpos com a filipina, marcador de esterol.

4.5 Ensaio da lactato-desidrogenase (LDH) para determinação de toxicidade em células hospedeiras

Visando reforçar a possibilidade de uso da RsAFP2 como agente antifúngico, verificamos a seletividade de sua toxicidade usando células animais (U87 e HBMEC) como modelo. Para tal, avaliamos a atividade da LDH, uma enzima intracelular que é liberada para o sobrenadante em caso de injúria celular e rompimento de membrana citoplasmática. Observamos que a atividade da LDH foi similar nas células controle (sem tratamento) e naquelas tratadas com a defensina na concentração de 10 μ M. Como controle positivo para a atividade da LDH lisamos as células com Triton X-100 (10 μ L por poço, de uma solução de Triton X-100 a 10% em água) (Figura 20). Esses resultados sugerem a ausência de toxicidade para essas células e reforçam a idéia de ausência de toxicidade para células de mamíferos.

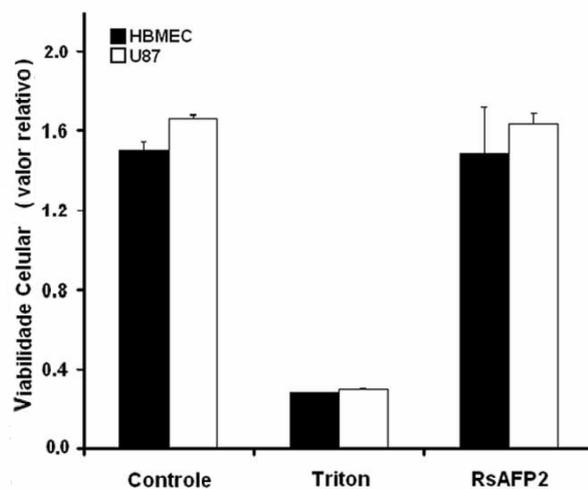


Figura 20: Viabilidade de células endoteliais (HBMEC) e macrófagos (U87) após tratamento com RsAFP2. Controles positivos de lise celular foram preparados por tratamento com detergente (Triton X-100). Os controles negativos representam as células animais cultivadas em DMEM, na ausência de RsAFP2.

4.6 Resistência da RsAFP2 a peptidases séricas

Um dos fatores limitantes mais importantes na avaliação do potencial terapêutico de peptídeos antimicrobianos para administração sistêmica é susceptibilidade dessas moléculas a peptidases séricas. Nesse sentido, avaliamos a atividade antimicrobiana da RsAFP2 (10 μ M) após sua exposição de 12 h ao meio de cultivo suplementado com 10, 20 ou 50% de soro fetal bovino. Como controle negativo incubamos o peptídeo na presença do meio de cultivo sem adição de soro. Como mostrado na Figura 21A, a RsAFP2 mantém sua atividade antifúngica mesmo após tratamento com soro em diferentes concentrações, indicando sua resistência a peptidases séricas. Para confirmar a atividade enzimática do soro utilizamos como controle a gomesina (1 μ M), um peptídeo antimicrobiano produzido pela aranha *Acanthoscurria gomesiana* susceptível a peptidases séricas (BARBOSA *et al.*, 2007). Como mostra o inserto na Figura 21A, a presença de 10% de soro no meio de cultura foi capaz de reduzir a atividade antifúngica da gomesina em aproximadamente 40%.

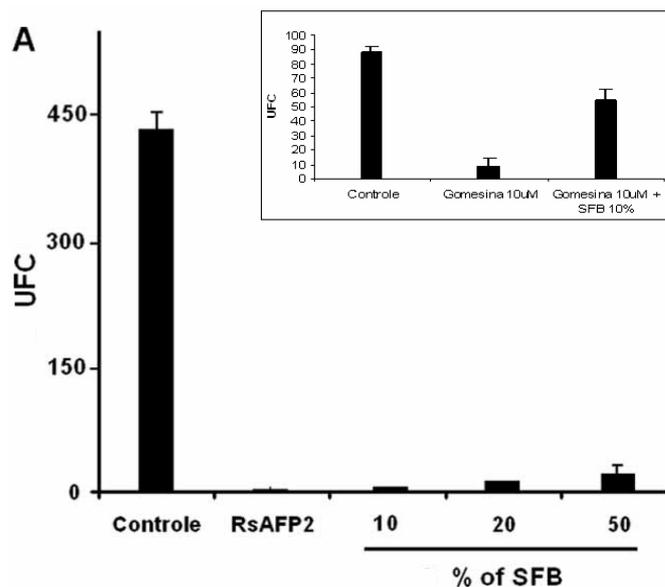


Figura 21: Análise da eficiência da defensina RsAFP2 sobre *C. albicans* após incubação em meio de cultura DMEM na presença de diferentes concentrações de soro fetal bovino (A) e análise da eficiência da gomesina sobre *C. albicans* após incubação em meio de cultura DMEM na presença de 10% de soro fetal bovino (inserto). A incubação com meio DMEM puro foi utilizado como controle negativo.

4.7 Testes de efeito antimicrobiano em camundongos - modelo *in vivo*

Visto que a defensina RsAFP2 não se mostrou tóxica quando incubada com células animais e que sua atividade antifúngica se manteve alta mesmo após incubação na presença de soro, resolvemos dar início aos testes com modelos de infecção em camundongos. Utilizamos modelos profiláticos de candidíase experimental na qual a administração da defensina RsAFP2 é feita pela via intravenosa 1 h depois (Figura 22A) ou 1 h antes (Figura 22B) da inoculação das leveduras. Conforme demonstrado nas Figura 22A e 22B os camundongos infectados com *C. albicans* e tratados com a defensina RsAFP2 apresentaram números reduzidos de UFC no rim, tecido alvo em ambos modelos de administração, quando comparados com os camundongos tratados com salina ($P < 0,01$). Vale ressaltar que, nas concentrações utilizadas em nossos estudos, a eficiência da RsAFP2 foi maior (Figura 22A) ou similar (Figura 22B) do que o antifúngico de escolha para o tratamento de candidíase, o fluconazol.

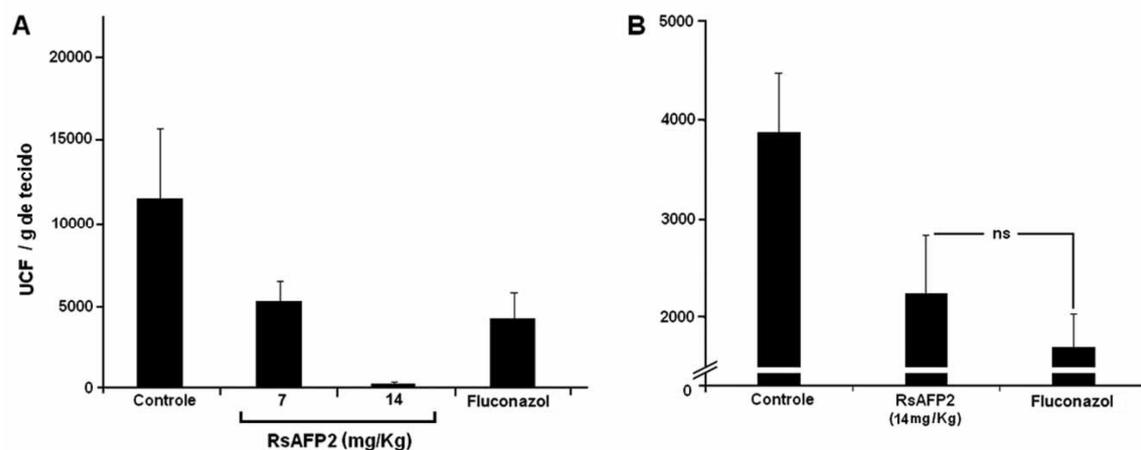


Figura 22 – Efeito da RsAFP2 no tratamento profilático de candidíase experimental. Os camundongos Balb/c (5 por grupo) foram inoculados com 2×10^5 leveduras (*C. albicans* -isolado 78) pela via intravenosa 1 h depois (A) e 1 h antes (B) do tratamento com RsAFP2 (7 ou 14 mg/Kg), fluconazol (10 mg/Kg) ou PBS em um volume final máximo de 50 μ L. Doses adicionais das drogas foram administradas a cada 24 h de infecção e após 5 dias os camundongos foram sacrificados para avaliação de UFC. Os rins foram homogeneizados em PBS e a suspensão plaqueada em Sabouraud sólido por 2 dias. As barras representam a média do número de UFC em cada população estudada. Diferenças estatísticas ($P < 0,01$) foram observadas entre os camundongos tratados (RsAFP2 e fluconazol) e os camundongos controles (PBS) em ambos os experimentos. Na Figura 22 B nenhuma diferença estatística (ns; $P = 0,152$) foi observada entre a contagem de UFC dos camundongos tratados com RsAFP2 e os camundongos tratados com fluconazol.

5- Discussão

Conforme descrito anteriormente, a ocorrência de infecções fúngicas vem aumentando expressivamente nas últimas décadas. A elevada toxicidade dos antifúngicos correntes e o alto custo para manutenção da terapia, associado com o aumento no número de cepas resistentes eleva a importância do desenvolvimento de novos alvos e novos agentes antifúngicos.

Dentre os possíveis alvos disponíveis, moléculas presentes na parede celular vêm sendo consideradas como potenciais estruturas-alvo para novos agentes antifúngicos. Em nosso laboratório descrevemos nos últimos anos a capacidade antifúngica de anticorpos anti-GlcCer *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES *et al*, 2000 e 2007; NIMRICHTER *et al*, 2004). Aliado aos resultados do nosso grupo, estudos realizados por THEVISSSEN e colaboradores (2004) demonstraram a ação *in vitro* de RsAFP2, uma defensina de planta, que também reconhece especificamente GlcCer de fungos e se mostrou como um eficiente agente antifúngico frente a *C. albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* em ensaios *in vitro*.

Neste trabalho, como parte de nossos objetivos, estendemos este espectro de ação para um número maior de cepas de *C. albicans* além de outras espécies de *Candida*. Todos os isolados de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* se mostraram sensíveis a concentrações micromolares de RsAFP2. No entanto, a espécie *C. albicans* foi a mais sensível quando comparada a outras espécies desse mesmo gênero. A espécie *C. tropicalis* apresentou, entre os isolados, maiores variações de sensibilidade à RsAFP2 quando comparada com as espécies *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. Embora essa diferença de susceptibilidade não seja explicada em nossos experimentos, algumas possibilidades serão discutidas adiante. Uma vez que *C. albicans* ainda é considerada a principal espécie causadora de candidíase tomamos esta como modelo para entender as diferenças na susceptibilidade entre os isolados frente a defensina. Nesse sentido avaliamos os níveis de GlcCer expressos por 3 diferentes isolados de *C. albicans* com susceptibilidades distintas a RsAFP2. De forma correspondente, os isolados

apresentaram quantidades de GlcCer de acordo com a susceptibilidade a ação da defensina. Esse fato poderia explicar o diferente perfil de susceptibilidade entre as diferentes espécies de *Candida*. Porém, para tal, faz-se necessária a análise da expressão de GlcCer nas demais espécies. Considerando, ainda, uma possível, porém pequena, variabilidade estrutural entre as GlcCer expressas em células fúngicas (NIMRICHTER *et al*, 2004), experimentos adicionais de expressão e reconhecimento do peptídeo seriam necessários para confirmar essa suposição. Além disso, não podemos excluir outras explicações, tais como a dificuldade de acesso do peptídeo a GlcCer fúngica na superfície celular nas diferentes cepas e a expressão e atividade de peptidases fúngicas. De fato, relatos na literatura sugerem que peptidases secretadas por fungos são importantes na atividade de peptídeos antifúngicos. A 5-histatina, por exemplo, é um peptídeo antimicrobiano produzido em humanos pelas glândulas parótida e submandibular-sublingual e que tem alta atividade anti-*Candida*. Esse peptídeo, entretanto, é eficientemente degradado pela Sap9 de *C. albicans*, resultando na perda da atividade anti-candida (MEILLER *et al*, 2009).

Dentre as espécies testadas apenas os isolados de *C. glabrata*, nas condições utilizadas neste estudo, se mostraram resistentes à ação da RsAFP2. Duas possibilidades foram levantadas para explicar este resultado. Em primeiro lugar, a resistência de *C. glabrata* à RsAFP2 poderia ser derivada da falta de expressão de GlcCer. Em segundo lugar, o acesso de RsAFP2 à molécula-alvo na superfície celular do fungo poderia estar bloqueado por algum componente da parede celular. Esta hipótese foi levantada com base em nossos estudos anteriores, mostrando que a ligação do anti-GlcCer à superfície da célula do fungo patogênico *F. pedrosoi* foi prejudicada pela presença de melanina, um pigmento produzido por diferentes espécies fúngicas (NIMRICHTER *et al*, 2005 a). Uma vez que, nas condições utilizadas em nosso trabalho espécies de *Candida* não costumam apresentar partículas convencionais de melanina em associação com a parede celular (MORRIS-JONES *et al*, 2005), os nossos esforços concentraram-se na primeira hipótese. Por isso, analisamos a expressão da GlcCer em *C. glabrata* como um meio para explicar a resistência a RsAFP2 observada nessa espécie. Após extração dos lipídeos neutros avaliamos a

expressão da GlcCer por cromatografia em camada fina. Embora tenhamos observado moléculas com R_f correspondente a GlcCer em todas as demais espécies testadas (dados não mostrados) bandas referentes a GlcCer não foram observadas nos extratos de *C. glabrata*. Este resultado está de acordo com o relato de SAITO e colaboradores (2005), que demonstraram que a cepa NBRC 0622 de *C. glabrata* não expressa a enzima ceramida glucosiltransferase (Cer:GlcT). Conforme descrito anteriormente a Cer:GlcT é requerida para transferir glucose para a ceramida. Conseqüentemente, a falta de expressão da enzima resulta na falta de produção de GlcCer. *S. cerevisiae*, por exemplo, também não expressa GlcCer e, conseqüentemente, é intrinsecamente resistente à RsAFP2 (THEVISSSEN *et al*, 2004). Adicionalmente, mutantes de *C. albicans* que não expressam Cer:GlcT são 20 vezes mais resistentes a ação da RsAFP2, quando comparados com a cepa selvagem. O mecanismo do peptídeo nessa concentração parece ser diferente, onde provavelmente uma associação inespecífica na ligação da defensina à superfície celular eletronegativamente carregada parece estar envolvido, uma vez que esse efeito é inibido pela adição de cátions no meio (THEVISSSEN, TERRAS & BROEKAERT, 1999).

No nosso estudo também avaliamos as alterações morfológicas de leveduras de *Candida* após a exposição à RsAFP2. Na verdade, RsAFP2 é classificada como uma defensina morfogênica devido aos seus efeitos sobre vários fungos filamentosos, onde promove a redução na ramificação das hifas (BROEKAERT *et al*, 1995). Neste contexto, estudos direcionados a avaliar os efeitos antimicrobianos de anticorpos anti-GlcCer demonstraram que *P. boydii* e conídios de *Coletotrichum gloesporioides* não são capazes de realizar seu processo de diferenciação quando incubados na presença dos anticorpos (DA SILVA *et al*, 2004; PINTO *et al*, 2002). Similarmente, a formação de pseudohifas em *C. albicans* por esses mesmos anticorpos também foi inibida (PINTO *et al*, 2002). Dessa forma podemos inferir que a associação de ligantes a GlcCer fúngica promove alterações significativas na superfície celular que controlam o processo de crescimento e diferenciação nesses organismos. A microscopia eletrônica de transmissão revelou notáveis mudanças na morfologia das leveduras de *Candida* incubadas com o peptídeo, incluindo vacuolização,

rarefação de citoplasma e alterações na associação da parede celular com a membrana plasmática. Alguns destes efeitos são semelhantes aos descritos quando espécies de *Fusarium* foram tratadas com o lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) (CIOPRAGA *et al*, 1999). Estes resultados sugerem que a ligação de moléculas antimicrobianas não apenas em GlcCer, mas em diferentes alvos presentes na parede celular pode resultar em alterações morfológicas similares em células fúngicas. Esses resultados indicam também que a ligação do peptídeo na superfície pode desencadear uma resposta derivada de um processo de sinalização. Isso levanta uma questão intrigante que será discutida adiante. Como uma molécula que se liga principalmente à parede celular pode gerar alterações morfológicas e promover a morte do fungo?

Assim como ocorre para os anticorpos anti-GlcCer, detalhes do mecanismo pelo qual a RsAFP2 atua ainda são desconhecidos. Diversos trabalhos descritos na literatura sugerem que peptídeos antimicrobianos têm como mecanismo geral de ação a permeabilização de membrana após ligação eletrostática com a superfície negativamente carregada pela presença de fosfolipídios (HANCOCK E SAHL, 2006). Em contraste, diferente das defensinas de humanos e de insetos, defensinas de plantas induzem permeabilização de membrana via interação de alta afinidade com sítios de ligação nas células fúngicas. Alguns desses receptores de defensinas foram identificados e apresentaram uma natureza esfingolipídica (THEVISSSEN *et al*, 2005). Buscando compreender o mecanismo de ação da RsAFP2, THEVISSSEN e colaboradores (2004) analisaram o efeito de uma variante da defensina RsAFP2, a RsAFP2(Y38G), que é desprovida de atividade antifúngica, era capaz de se ligar a glucosilceramidas, mas não causava permeabilização da membrana em *Pichia pastoris*. Além disso, demonstraram que a adição de RsAFP2(Y38G) ao meio não inibia a ação da RsAFP2, revelando que a ligação a GlcCer é reversível. Estes experimentos sugeriram uma interação específica entre a RsAFP2 com a GlcCer e levantou a possibilidade de que o glicolipídeo seria uma porta de entrada para as defensinas. Após o processo de interação inicial mediada pela GlcCer, a defensina poderia atingir alvos citoplasmáticos. Porém, experimentos adicionais são necessários para confirmação dessa hipótese. Adicionalmente,

esses resultados também reforçam uma idéia de resposta via um mecanismo de sinalização celular após o reconhecimento mais estável do peptídeo pela GlcCer. De fato, as alternativas mais aceitas para a ação das defensinas de plantas incluem a permeabilização da membrana após a interação com os alvos ou mesmo um processo de sinalização celular mediado pela porção lipídica do GSL; porém, outras propostas vêm sendo apresentadas.

Esfingolipídeos, como GlcCer e M(IP)₂C, e esterol tem um importante papel na formação de plataformas lipídicas chamadas “lipid rafts” (THEVISSEN *et al*, 2005). Estas plataformas contribuem para morfogênese fúngica, permitindo o particionamento de proteínas específicas envolvidas nas vias de transdução de sinal, na adesão celular, polaridade celular e em outros processos (THEVISSEN *et al*, 2005). Foi demonstrado que a ligação da defensina DmAMP1 ao M(IP)₂C, torna-se mais intensa mediante adição de esterol em ensaios *in vitro* (THEVISSEN *et al*, 2003). Isso levanta a possibilidade do envolvimento de “lipid rafts” nessa interação, mas isso requer uma investigação mais detalhada. Possivelmente, a interação de DmAMP1 com essas plataformas lipídicas pode resultar em um enriquecimento da defensina nessas regiões da membrana. Porém, se essa concentração é necessária para a permeabilização da membrana ainda não está claro. Alternativamente, a atividade antifúngica pode resultar de um distúrbio provocado pela associação da defensina com os esfingolipídeos alterando a formação ou a polarização das plataformas lipídicas (THEVISSEN *et al*, 2005).

No caso de moléculas ligantes de GlcCer, como é o caso da defensina RsAFP2, os mecanismos podem tornar-se ainda mais complexos, devido à ampla distribuição desses lipídeos na parede celular. No entanto, dados anteriores e os resultados apresentados neste trabalho apóiam a idéia de que defensinas de planta atuam por um mecanismo diferente, a interação com um lipídio específico de superfície celular. AERTS e colaboradores (2007), demonstraram que a defensina RsAFP2 não promove a ruptura de vesículas artificiais enriquecidas em GlcCer fúngica (AERTS *et al*, 2007). Esses resultados mostraram que o peptídeo não tem efeito direto na permeabilização da membrana. Os autores sugerem que a associação de RsAFP2 com GlcCer

fúngica ativaria uma sinalização que levaria a morte celular (NIMRICHTER *et al*, 2008).

Os esfingolípídeos fúngicos antes considerados apenas componentes estruturais de membranas de células eucarióticas agora destacam-se como importantes moléculas sinalizadoras na regulação, crescimento e resposta celular ao estresse (THEVISSSEN *et al*, 2005). Precursores metabólicos de esfingolípídeos como ceramidas (Cer), bases de cadeia longa (LCBs) e bases de cadeia longa fosfatadas (LCBP), que afetam o crescimento celular, diferenciação e morte celular, vêm sendo estudados em células de mamíferos e em células fúngicas (KOBAYASHI & NAGIEC, 2003). Nesses tipos celulares, Cer e LCBs normalmente inibem a proliferação e promovem a apoptose, enquanto o LCBP promove efeitos contrários. Assim, os níveis relativos de Cer, LCBs e LCBP nas células que determinam o destino a ser tomado (KOBAYASHI & NAGIEC, 2003). Células apoptóticas apresentam diversos marcadores, incluindo produção endógena de ROS. Assim, se a produção de ROS induzida por RsAFP2 estimularia a maquinaria apoptótica ainda não foi investigado. Porém, alguns antifúngicos descritos como indutores de ROS, como a anfotericina B, induzem a apoptose em levedura (AERTS *et al*, 2007).

O mecanismo de ação da RsAFP2 também parece envolver a indução da produção de ROS. Em experimentos *in vitro*, a incubação do fungo com o peptídeo leva a produção de ROS, que culmina com a morte do organismo (AERTS *et al*, 2008). Esses resultados sugerem fortemente que a associação da RsAFP2 com a GlcCer na superfície fúngica é capaz de iniciar um mecanismo de sinalização celular. De fato, conforme citado anteriormente, outros agentes antifúngicos também parecem promover a produção de ROS. KOBAYASHI e colaboradores (2002) descreveram que a produção endógena de ROS é importante para o efeito antifúngico do miconazol em *C. albicans*. Esses autores demonstraram também que a produção de ROS em diferentes isolados de *C. albicans* é inversamente proporcional à concentração mínima inibitória (MIC) de miconazol.

Nossos resultados indicam que a defensina RsAFP2 interage especificamente com regiões mais externas da superfície da célula, apoiando a

idéia de que ligantes de GlcCer em células fúngicas preferencialmente interagem com a parede celular (NIMRICHTER *et al*, 2005; RODRIGUES *et al*, 2000). Estes resultados sugerem um novo mecanismo (Figura 23) pelo qual uma molécula ligante de GlcCer poderia controlar o crescimento da células fúngicas na parede celular (NIMRICHTER *et al*,2008). No entanto, ainda não sabemos como se dá o efeito da interação entre o peptídeo e a GlcCer localizada na parede. A hipótese inicialmente sugerida (THEVISSSEN *et al*, 2005) é totalmente baseada em uma interação do peptídeo com a membrana plasmática em domínios lipídicos, que culminava em um mecanismo de sinalização intracelular. Embora essa hipótese ainda não possa ser descartada, nossos resultados levantam um nova possibilidade, baseada em uma interação entre a RsAFP2 e a GlcCer na parede celular. Neste sentido, uma série de estudos demonstram que moléculas que se ligam a componentes de parede celular fúngica são capazes de inibir o crescimento fúngico (revisto por NIMRICHTER *et al*, 2005b). Os alvos incluem GSL fúngicos, proteínas de choque térmico, melanina, histonas e adesinas de parede celular. Em células vegetais, por exemplo, é bem conhecido que componentes de parede celular, ligantes de lectina, estão envolvidas na defesa inata contra bactérias e fungos (KEEN, 1992). Além disso, conforme discutido anteriormente, a lectina WGA inibe o crescimento de espécies de *Fusarium* (CIOPRAGA *et al*, 1999). A WGA reconhece oligômeros de quitina fúngicos na parede celular e induz alterações morfológicas, tais como um aumento no volume celular, vacuolização de conteúdo celular e lise de hifas.

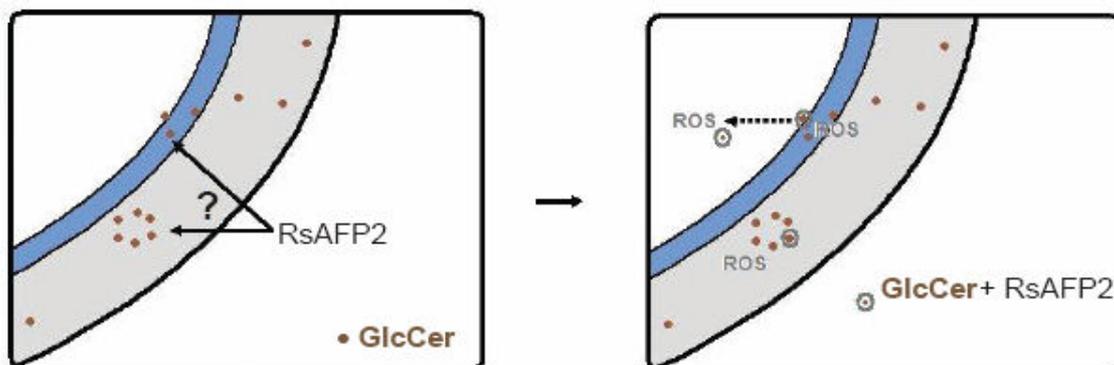


Figura 23 – A GlcCer localizada na parede celular e / ou na membrana plasmática é um potencial alvo para a defensina RsAFP2 e desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na produção ROS. Modificado de NIMRICHTER *et al*, 2008.

Assim, ainda permanece em questão se a produção de ROS aconteceria já com a ligação de RsAFP2 na GlcCer presente na parede celular ou se é necessário a ligação na GlcCer presente na membrana para desencadear a produção de ROS, ou ainda se os dois mecanismos poderiam ocorrer simultaneamente (Figura 23).

Conforme descrito por THEVISSSEN e colaboradores (2004), a RsAFP2 não interage com glucosilceramidas estruturalmente diferentes daquelas expressas em fungos, sugerindo baixa toxicidade para células hospedeiras. Neste contexto, linhagens celulares humanas e de camundongos foram tratadas com RsAFP2 na concentração de 10 μ M, a maior concentração utilizada nos nossos experimentos de inibição do crescimento fúngico, para confirmar esta hipótese. Embora os AMPs geralmente apresentem alta toxicidade para células animais (MARR, GOODERHAM & HANCOCK, 2006), nossos resultados sugeriram que a RsAFP2 não induz alterações expressivas na viabilidade das células animais testadas. Ainda em favor de seu uso em modelos *in vivo*, observamos que o peptídeo permaneceu ativo mesmo depois da exposição a peptidases séricas. Considerando que um dos principais problemas para a utilização de peptídeos na terapia contra doenças infecciosas é a sua degradação por peptidases séricas, a RsAFP2 se apresenta como potencial alternativa. Nesse contexto, detalhes estruturais da RsAFP2 que expliquem essa resistência devem ser avaliados. Essa informação pode ser útil para realização de modificações estruturais em peptídeos já descritos, com o objetivo final de aumentar a resistência a peptidases séricas.

Os resultados promissores nos ensaios *in vitro* nos levaram a analisar o efeito desse peptídeo em um modelo murino de candidíase. Os ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* são considerados um grande filtro na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. No nosso estudo avaliamos o tratamento profilático com administração da defensina 1 h antes da infecção e um modelo de tratamento com 1 h depois da infecção. Este ensaio pré-clínico comprovando a eficácia *in vivo* foi de extrema importância para a validação dos ensaios *in vitro* anteriores. Adicionalmente possibilitou a validação da GlcCer como alvo para um antifúngico em um modelo animal.

Conforme esperado, o tratamento com o peptídeo 1 h antes da infecção nos revelou um resultado mais efetivo na redução da carga fúngica. Isso pode ser explicado pela rápida ação da defensina, que já estaria bem distribuída nos tecidos, levando a um acesso mais eficiente às leveduras e a uma resposta mais eficaz. Entretanto essa hipótese ainda precisaria ser investigada.

A capacidade da RsAFP2 apresentar atividade contra diferentes cepas e espécies de *Candida*, a potencial ausência de toxicidade em células de mamíferos, e o fato de RsAFP2 poder controlar a candidíase *in vivo* apontam para o potencial deste defensina como um novo agente antifúngico para combater infecções por *C. albicans*.

6- Conclusões:

- RsAFP2 pode ser considerado um potente agente anti-*Candida* que apresenta toxicidade seletiva para células fúngicas em modelos *in vitro* e *in vivo*.

- Nossos dados apóiam fortemente a validação da GlcCer como um alvo para drogas antifúngicas, como já demonstrado na literatura (Thevissen et al. 2005, Rodrigues et al., 2000, et al Nimrichter., 2004).

- Nossos resultados apresentam uma nova proposta para mecanismo de ação que ainda depende de confirmação experimental, onde uma molécula ligante de lipídeo presente na parede celular pode controlar o crescimento da célula fúngica. Esta proposta está de acordo com as discussões mais recentes da literatura que reconhece a parede celular como uma estrutura mais dinâmica e com funções que vão além da sua capacidade protetora.

- Estudos futuros serão de extrema relevância para confirmar o mecanismo pelo qual esse peptídeo atua.

- Estudos futuros pré-clínicos (farmacocinéticos e farmacodinâmicos) serão, portanto, de extrema importância para comprovar o potencial desse peptídeo como um candidato promissor ao desenvolvimento de um novo agente antifúngico.

7- Bibliografia:

AERTS, A.M.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; CAMMUE, B.P.A. & THEVISSSEN K. **The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins.** Cellular and molecular Life Sciences. 65(13):2069-2079, 2008.

AERTS, A.M.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; MEERT, E.M.K.; LI, Q.T.; CAMMUE, B.P.A. & THEVISSSEN K. **The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, Involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*.** Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 13: (243-247), 2007.

BARBOSA, F.M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R.A.; MIRANDA, A.; NIMRICHTER, L. & RODRIGUES, M.L. **Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole.** FEMS Microbiology Letters. 274(2):279-86. 2007.

BARRETO-BERGTER, E.; PINTO, M.R. & RODRIGUES M.L.. **Structure and biological functions of fungal cerebroside.** An Acad Bras Cienc. 76(1):67-84, 2004.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D.J. & HANCOCK, R.E. **A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity.** Curr Protein Pept Sci. 6(1):35-51. 2005.

BROGDEN, K.A. **Antimicrobial Peptides: Pore formers or Metabolic inhibitors in bacteria?** Nature Review Microbiol. (3):238-25, 2005.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.; CAMMUE, B.P. & OSBORN, R.W. **Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system.** Plant Physiology. 108(4):1353-8. 1995.

CALDERONE, R.A. & FONZI, W.A. **Virulence factors of *Candida albicans*.** Trends Microbiology. 9(7):327-35. 2001.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A & QUINDÓS G. **Antifungal agents: Mode of action in yeast cells.** Revista Espanhola de Quimioterapia. 19 (2): 130-139. 2006.

CHAPMAN, S.W.; SULLIVAN, D.C. & CLEARY, J.D. **In search of the holy grail of antifungal therapy.** Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 119:197-216.2008.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; & DOYLE, R.J. ***Fusarium sp.* growth inhibition by wheat germ agglutinin.** Biochim Biophys Acta. 1428(2-3):424-32. 1999.

CLEMONS, K. V. & STEVENS, A. **Efficacy of the partricin derivative SPA-S-753 against systemic murine candidosis.** J Antimicrob Chemother 47:183-6.2001.

COLLINS, B.E.; YANG, L.J. & SCHNAAR, R.L. **Lectin-mediated cell adhesion to immobilized glycosphingolipids.** Methods Enzymol. 312: 438–446, 2000.

COLOMBO, A, L, & GUIMARÃES, T. **Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.*** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36 (5):599-607. 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D. & MORGAN, J. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers for the**

brazilian network candidemia study. Journal of Clinical Microbiology. 44(8) 2816–2823, 2006.

COWEN, L.E. **The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype.** Nature Reviews Microbiology. 6(3):187-98. 2008.

COWEN, L.E. & STEINBACH, W.J. **Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance.** Eukaryot Cell. 7(5):747-64. 2008.

DA SILVA, A.F.; RODRIGUES, M.L.; FARIAS, S.E.; ALMEIDA, I.C.; PINTO, M.R. & BARRETO-BERGTER, E. **Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells.** FEBS Lett. 561(1-3):137-43, 2004.

ESPINEL-INGROFF A. **Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi.** Rev Iberoam Micol. 25(2):101-6. 2008.

FOLCH, J., M. LEES, AND G. H. SLOANE STANLEY. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** J. Biol. Chem 226:497–509. 1957.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M.M.; BATISTA, E.J.; SEABRA, S.H.; DE SOUZA, W. & ROZENTAL, S. **Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells.** Microsc Res Tech. 69(9):729-37. 2006.

GORDON, Y.J.; ROMANOWSKI, E.G & MCDERMOTT, A. M. **A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti- infective drugs.** Curr Eye Res. 30(7): 505–515. 2005.

HANCOCK, R.E.& DIAMOND, G. **The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences.** Trends Microbiol. 8(9):402-10. 2000.

HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies.** Nature Biotechnology. 24(12) 1551-7.2006.

HAKOMORI, S. **Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane.** Current Opinion in Hematology. 10 (1):16-24. 2003.

HEISE, N.; GUTIERREZ, A.L.; MATTOS, K.A.; JONES, C.; WAIT, R.; PREVIATO, J.O. & MENDONÇA-PREVIATO, L. **Molecular analysis of a novel family of complex glycoinositolphosphoryl ceramides from *Cryptococcus neoformans*: structural differences between encapsulated and acapsular yeast forms.** Glycobiology. 12(7):409-20. 2002.

JENSSEN, H.; HAMILL, P. & HANCOCK, R.E.W. **Peptide antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Review. 19(3) 491–511, 2006.

KEEN, N.T. **The molecular biology of disease resistance.** Plant Mol Biol. 19(1):109-22. 1992.

KOBAYASHI, S.D. & NAGIEC, M.M. **Ceramide/long-chain base phosphate rheostat in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of ceramide synthesis by Elo3p and Cka2p.** Eukaryot Cell. 2(2):284-94. 2003.

KOBAYASHI, D.; KONDO, K.; UEHARA, N.; OTOKOZAWA, S.; TSUJI, N.; YAGIHASHI, A. & WATANABE, N. **Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect.** Antimicrob Agents Chemother. 46(10):3113-7. 2002.

- LIU, M.; HEALY, M.D.; DOUGHERTY, B.A.; ESPOSITO, K.M.; MAURICE, T.C.; MAZZUCCO, C.E.; BRUCCOLERI, R.E.; DAVISON, D.B.; FROSCO, M.; BARRETT, J.F. & WANG, Y.K. **Conserved fungal genes as potential targets for broad-spectrum antifungal drug discovery.** Eukaryot Cell. 5(4):638-49. 2006.
- MACCIONI, H.J.; DANIOTTI, J.L. & MARTINA, J.A. **Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus.** Biochim Biophys Acta. 1437(2):101-18. 1999.
- MACIEL, D.M.; RODRIGUES, M.L.; WAIT, R.; VILLAS BOAS, M.H.; TISHER, C.A. & BARRETO-BERGTER, E. **Glycosphingolipids from *Magnaporthe grisea* cells: expression of a ceramide dihexoside presenting phytosphingosine as the long chain base.** Arch Biochem Biophys 405: 205-213. 2002.
- MARCUS, J. & POPKO, B. **Galactolipids are molecular determinants of myelin development and axo-glial organization.** Biochim Biophys Acta. 1573(3):406-13. 2002.
- MARR, A.K.; GOODERHAM, W.J. & HANCOCK, R.E. **Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook.** Curr Opin Pharmacol. 6(5):468-72. 2006.
- MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, M. D. S. & MOSS M. M. D. **The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000.** The new england journal of medicine. 348 (16):1546-1554. 2003.
- MARTINEZ, R. **An update on the use of antifungal agents.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. 32(5):449-60. 2006.
- MASCHMEYER, G. **The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats.** Int J Antimicrob Agents. 1:3-6. 2006.
- MEILLER, T.F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; SHIRTLIFF, M.E.; SCHEPER, M.A.; WINKLER, R.; TON, A. & JABRA-RIZK, M.A. **A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide.** Plos One. 4(4):5039. 2009.
- MERRILL AH, J.R.; SCHMELZ EM; DILLEHAY, D.L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J.A.; SCHROEDER, J.J.; RILEY, R.T.; VOSS, K.A. & WANG, E. **Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology.** Toxicol Appl Pharmacol. 1997. 142(1):208-225, 1997.
- MORRIS-JONES R, GOMEZ BL, DIEZ S, URAN M, MORRIS-JONES SD, CASADEVALL A, NOSANCHUK JD, HAMILTON AJ. **Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection.** Infect Immunity. 73(9):6147-50. 2005.
- NAHAR, M., MISHRA, D. DUBEY, V. & JAIN, N. K. **Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 4: 252–261. 2008.
- NIMRICHTER, L., E. BARRETO-BERGTER, R. R. MENDONCA-FILHO, L. F. KNEIPP, M. T. MAZZI, P. SALVE, S. E. FARIAS, R. WAIT, C. S. ALVIANO, AND M. L. RODRIGUES. **A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages.** Microbes and Infection 6:657-65. 2004.
- NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M.D.; LEITAO, E.A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E.S.; ALMEIDA, S.R.; ALMEIDA, I.C.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E. & RODRIGUES, M.L.(A) **Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological**

functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. Infect Immun. 73(12):7860-8, 2005.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L.; RODRIGUES, E.G. & TRAVASSOS, L.R. (B). **The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall.** Microbes Infection. 7(4):789-798, 2005.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L.; RODRIGUES, E.G. & TRAVASSOS, L.R. **Sophisticated functions for a simple molecule: the role of glucosylceramide in fungal cells.** Lipids Insights. (2) 61-73. 2008

OBEID, L.M.; OKAMOTO, Y. & MAO, C. **Yeast sphingolipids: metabolism and biology.** Biochim Biophys Acta. 1585(2-3):163-71, 2002.

OURA, T.& KAJIWARA, S. **Disruption of the sphingolipid Delta8-desaturase gene causes a delay in morphological changes in *Candida albicans*.** Microbiology. (154):3795-803. 2008.

PFALLER, M.A. & DIEKEMA, D.J. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** Clinical Microbiology Reviews. 10(1) 133–163, 2007.

PhRMA. **Drug discovery and development: understanding the R&D process.** Washington, D.C. 2007. Disponível em: <http://www.innovation.org>.

PINTO, M.R.; RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; HAIDO, R.M.; WAIT, R. & BARRETO-BERGTER, E. **Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation.** Glycobiology. 12(4): 251-60, 2002.

RAMAMOORTHY, V.; CAHOON, E. B.; THOKALA, M.; KAUR, J.; LI J. & SHAH, D. M. **Sphingolipid C-9 methyltransferases are important for growth and virulence but not for sensitivity to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*.** Eukaryotic Cell 8(2):217–229. 2009.

RICHARDSON, M. & LASS-FLÖRL, C. **Changing epidemiology of systemic fungal infections.** Clinical Microbiology and Infection. 14 (Suppl) 4:5-24. 2008.

RITTERSHAUS, P. C.; KECHICHIAN, T. B.; ALLEGOOD, J. C.; MERRILL, A. H.; JR.; HENNIG, M.; LUBERTO, C. & DEL POETA M. **Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*.** J Clin Invest 116:1651-9. 2006.

RODRIGUES, M.L.; SHI, L.; BARRETO-BERGTER, E.; NIMRICHTER, L.; FARIAS, S.E.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. & NOSANCHUCK, J.D. **Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection.** Clinical and Vaccine Immunology. 14(10):1372-1376, 2007.

RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; MIRANDA, K.R.; FRANZEN, A.J.; ROZENTAL, S.; DE SOUZA, W.; ALVIANO, C.S. & BARRETO-BERGTER, E. **Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth.** Infect Immun. 68(12): 7049-60, 2000.

SAITO, K., N. TAKAKUWA, M. OHNISHI, AND Y. ODA. **Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast.** Appl. Microbiol. Biotechnol. (71)515–521. 2005.

- SCHNAAR, R.L. (A) **Isolation of glycosphingolipids**. Methods Enzymol. 230:348-70, 1994.
- SCHNAAR, R.L. (B) **Thin-layer chromatography of glycosphingolipids**. Methods Enzymol. 230:371-89, 1994.
- SCHAAPER, W.M.M.; POSTHUMS, G.A.; PLASMAN, H.H.; SIJTSMA, L.; FANT, F.; BORREMANS, F.A.M.; THEVISSSEN, K.; BROEKAERT, W.R.; MELOEN, R.H. & AMERONGEN, A.V. **Synthetic peptides derived from the β 2- β 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site**. J. Peptide Res. 57: 409-418, 2000.
- SHAO, P.L.; HUANG, L.M. & HSUEH, P.R. **Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections**. International Journal of Antimicrobial Agents. 30(6):487-95. 2007.
- TERRAS, F.R.; SCHOOF, H.M.; DE BOLLE, M.F.; VAN LEUVEN, F.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P. & BROEKAERT, W.F. **Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds**. J Biol Chem. 267(22):15301-15309, 1992.
- TERRAS, F.R.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; OSBORN, R.W.; KESTER, A.; REES, S.B.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F. & VANDERLEYDEN, J. **Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense**. Plant Cell. 7(5):573-88, 1995.
- THEVISSSEN, K.; FERKET, K.K.; FRANCOIS, I.E. & CAMMUE, B.P. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components**. Peptides. 24(11):1705-12, 2003.
- THEVISSSEN, K.; FRANCOIS, I.E.; AERTS, A.M. & CAMMUE, B.P. **Fungal sphingolipids as targets for the development of selective antifungal therapeutics**. Curr Drug Targets. 6(8):923-8, 2005.
- THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H.H.; THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A. & FRANÇOIS, I.E.J.A. **Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins**. Drug discovery today. 6 (21/22):966-971, 2007.
- THEVISSSEN, K.; TERRAS, F.R. & BROEKAERT, W.F. **Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth**. Appl Environ Microbiol. 65(12): 5451-5458. 1999.
- THEVISSSEN, K.; WARNECKE, D.C.; FRANCOIS, I.E.; LEIPELT, M.; HEINZ, E.; OTT, C.; ZHRINGER, U.; THOMMA, B.P.; FERKET, K.K. & CAMMUE, B.P. **Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides**. J Biol Chem. 279(6):3900-5. 2004.
- WACHTLER, V. & BALASUBRAMANIAN, M.K. **Yeast lipid rafts?-an emerging view**. Trends Cell Biol. 16(1):1-4. 2006.
- YANG, Y.L. **Virulence factors of *Candida* species**. J Microbiol Immunol Infect. 36(4):223-8. 2003.

In Vitro Activity of the Antifungal Plant Defensin RsAFP2 against *Candida* Isolates and Its In Vivo Efficacy in Prophylactic Murine Models of Candidiasis[∇]

Patricia M. Tavares,¹ Karin Thevissen,² Bruno P. A. Cammue,² Isabelle E. J. A. François,²
 Eliana Barreto-Bergter,¹ Carlos P. Taborda,³ Alexandre F. Marques,^{3,‡}
 Marcio L. Rodrigues,^{1,†} and Leonardo Nimrichter^{1,*†}

Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS, Bloco I, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941590, Brazil¹; Centre of Microbial and Plant Genetics (CMPG), Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, 3001 Heverlee, Belgium²; and Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil³

Received 4 April 2008/Returned for modification 24 May 2008/Accepted 19 September 2008

We show that RsAFP2, a plant defensin that interacts with fungal glucosylceramides, is active against *Candida albicans*, inhibits to a lesser extent other *Candida* species, and is nontoxic to mammalian cells. Moreover, glucosylceramide levels in *Candida* species correlate with RsAFP2 sensitivity. We found RsAFP2 prophylactically effective against murine candidiasis.

Disseminated candidiasis is associated with high mortality and drug resistance (8, 22). Since treatment of these infections is ineffective in a number of cases, the search for new anticandidal compounds, as well as specific cellular targets, is critical. A molecular target studied by our group is the glycosphingolipid glucosylceramide (GlcCer; cerebroside), which is present at the cell surface (membrane and cell wall) of most pathogenic fungi (4, 15, 21) and is structurally distinct from its mammalian counterpart (1, 4, 14, 15, 17). Apart from structural features, GlcCers are important regulators of differentiation and pathogenicity of human and plant mycopathogens (7, 12, 14, 17–19, 21). All together, these characteristics make fungal GlcCer an attractive target for the development of new antifungal drugs. In this regard, it was previously demonstrated that passively administered anti-GlcCer antibodies prolong survival of mice lethally infected with *Cryptococcus neoformans* (20). Moreover, fungal GlcCers have previously been shown to constitute the target for RsAFP2, an antifungal defensin from radish seeds (27). Interaction between RsAFP2 and fungal GlcCer initiates a signaling cascade that results in the production of reactive oxygen species and fungal death (1).

We evaluated the RsAFP2 activity as an anticandidal agent. RsAFP2 was purified as described previously (25) and tested against different *Candida* species and isolates. As demonstrated in Fig. 1, seven isolates of *Candida albicans* were sus-

ceptible to RsAFP2 in a dose-dependent manner. Different isolates of *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* were also susceptible to RsAFP2 but to a lesser extent than *C. albicans* (Fig. 1B, C, D, and E). All tested *C. glabrata* strains were resistant to RsAFP2 (Fig. 1F), which is in accordance with the inability of this species to synthesize GlcCer (Fig. 2A) (23).

To establish a link between susceptibility to RsAFP2 and GlcCer content in *C. albicans*, we investigated the levels of cerebroside in the strains 2A, 78, and 12A, which were, respectively, highly, moderately, and weakly susceptible to RsAFP2 (Fig. 1A). Lipids from yeast cells were extracted with chloroform-methanol (2:1, 1:1, and 1:2 [vol/vol]) (14). Extracts were pooled, dried, and partitioned according to Folch's method (9). Lipids from Folch's lower phase were normalized according to the total dry weight and analyzed with high-performance thin-layer chromatography plates developed with chloroform-methanol-water (65:25:4 [vol/vol/vol]). The spots were visualized by charring with orcinol-H₂SO₄ (24). To determine the relative amount of GlcCer, Scion Image software (NHI; Scion Corporation) was used. Orcinol-positive bands corresponding to standard fungal GlcCer were visualized in extracts of all *C. albicans* strains tested (Fig. 2A). Densitometry revealed a direct relationship between GlcCer content and RsAFP2 susceptibility (Fig. 2B). No bands corresponding to GlcCer were visualized in *C. glabrata* lipid extracts (Fig. 2A). In this regard, *Saccharomyces cerevisiae*, which does not produce GlcCer, also is resistant to RsAFP2 (23, 27). Note that *C. glabrata* is phylogenetically closer to *S. cerevisiae* than to other species of the *Candida* genus (3, 11).

Inactivation of peptides by serum enzymes is a limiting problem for their systemic administration. To check the susceptibility of RsAFP2 to serum peptidases, *Candida* yeasts (2×10^3) were incubated overnight with RsAFP2 (10 μM), which was previously treated with 10, 20, or 50% fetal bovine serum

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS, Bloco I, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941590, Brazil. Phone: 55 21 25626711. Fax: 55 21 25606344. E-mail: nimrichter@micro.ufrj.br.

† L.N. and M.L.R. share senior authorship on this article.

‡ Present address: Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX.

∇ Published ahead of print on 29 September 2008.

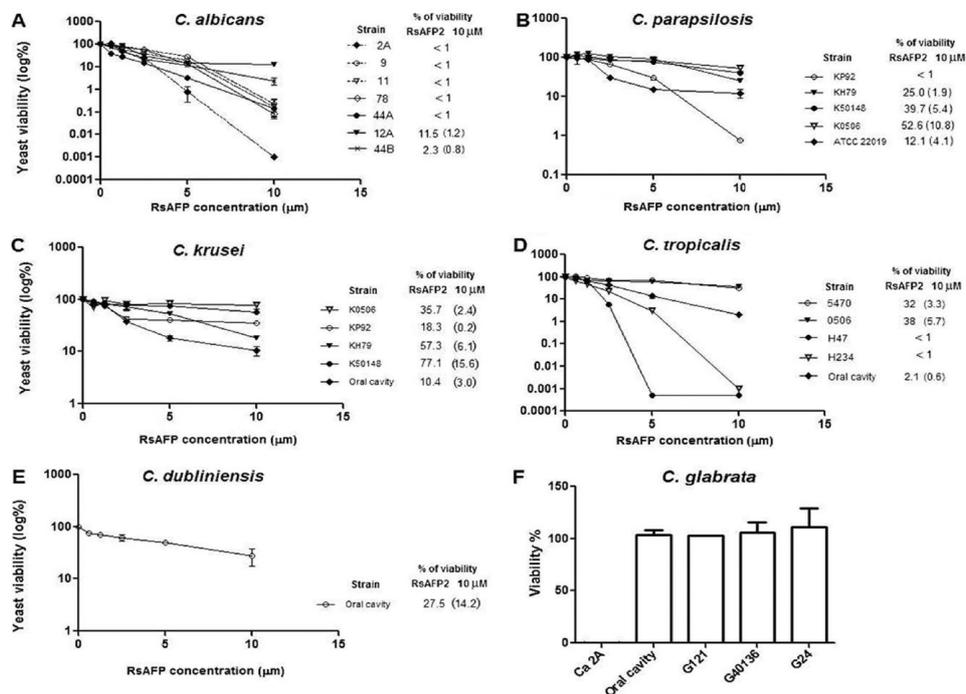


FIG. 1. Susceptibility of different *C. albicans* strains and *Candida* species to RsAFP2. (A to E) *Candida* isolates and strains were cultivated in potato dextrose broth/yeast peptone dextrose broth (pH 7.0) for 24 h at room temperature (27). Yeast cells (2×10^3) were treated overnight with different concentrations (0.6 to 10 µM) of RsAFP2. The percentage of viability for each RsAFP2-treated *Candida* species relative to that of control treatment (water) was calculated after plating the treated yeast on brain heart infusion agar dishes for CFU counting. (F) *C. glabrata* and *C. albicans* (Ca 2A) isolates were treated with 10 µM RsAFP2. Survival rates, determined as the percentage of viability, of the different strains after treatment with 10 µM RsAFP2 are shown.

(FBS). Gomeisin (1 µM), an antimicrobial peptide susceptible to hydrolysis by serum peptidases, was used as control (2). After exposure to FBS, the remaining antifungal effect was evaluated. Treatment of RsAFP2 with serum did not result in significant changes of its antifungal effect (Fig. 3A). On the

other hand, the presence of 10 and 20% FBS promoted a decrease of approximately 40 and 100% in gomeisin activity, respectively (data not shown). Therefore, we concluded that, although serum enzymes were functional, they were not able to eliminate the RsAFP2 effect. We also evaluated the toxicity of

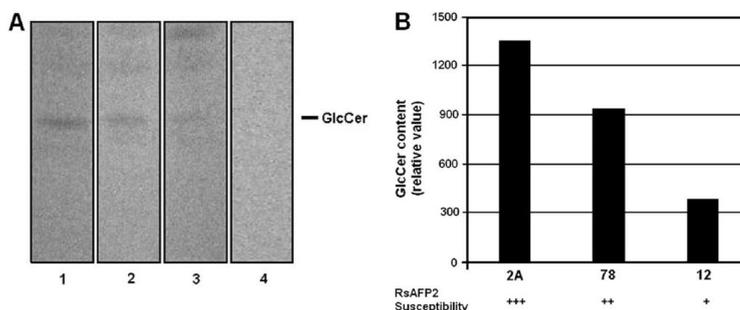


FIG. 2. Correlation between GlcCer content and RsAFP2 susceptibility in *Candida* sp. (A) Expression of GlcCer by three different strains of *C. albicans* (lanes 1, strain 2A; 2, strain 78; 3, strain 12A) and one *C. glabrata* isolate (lane 4) (+++ indicates more susceptible; ++, intermediate susceptibility; +, less susceptible). GlcCer was extracted with organic solvents, and the resulting molecules were analyzed by high-performance thin-layer chromatography. (B) Densitometric analysis of the chromatogram shown in panel A for the different *C. albicans* strains was performed by using Scion Image (NHI) software, and the relative content of GlcCer in each strain is shown.

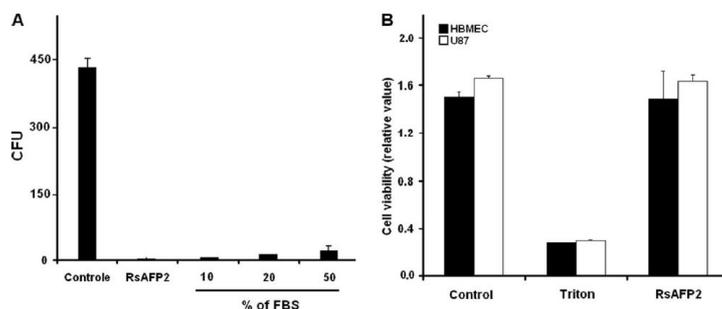


FIG. 3. Antifungal activity of RsAFP2 after treatment with serum and its toxicity to human cells. (A) After treatment with 10 μ M RsAFP2 with different concentrations of serum (% of FBS), the peptide antifungal activity against *C. albicans* (strain 12A) cells (2×10^5) was assessed using CFU determination. (B) Monolayers of primary human brain endothelial cells (HBMEC) and the astroglia tumor-derived cell line (U87) in 96-well plates in serum-free medium were incubated overnight with RsAFP2 (10 μ M), and culture supernatants were collected for LDH determination. Positive controls consisted of supernatants of Triton X-100 (10%) and gomesin (data not shown) cultures. The negative control corresponded to supernatant from untreated cells.

RsAFP2 by lactate dehydrogenase (LDH) release (2, 6). Cell monolayers (human brain endothelial cells or strain U87) were incubated with RsAFP2 (10 μ M) and culture supernatants collected after 24 h. Positive controls consisted of Triton X-100 (10%) lysates or culture supernatants of cells treated with 10 μ M gomesin (2). RsAFP2 and untreated cells did not release significant levels of LDH (Fig. 4B). In contrast, gomesin and Triton treatments resulted in expressive enzyme release, indicating cell damage (not shown). These results support the conclusion that RsAFP2 has limited toxicity to mammalian cells.

Fungal burden in the kidney of infected mice was used to evaluate the prophylactic activity of RsAFP2 in murine models of infection with *C. albicans*, as described in previous studies (5, 16). Mice were inoculated intravenously via the lateral tail vein with 2×10^5 yeasts of *C. albicans* in saline. RsAFP2 was injected intravenously 1 h before or after the challenge with *C. albicans* (with 7 or 14 mg/kg of body weight, administered in 50 μ l of saline). Four similar subsequent injections were made after 24-h intervals. Control groups were treated with 10-mg/kg

doses of fluconazole or saline (10, 13) by following the same protocol. Mice were sacrificed 5 days after fungal infection. Kidneys were excised, weighed, and homogenized, and the pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (1 ml). Samples (100 μ l) were plated onto solid brain heart infusion plates, and CFU were determined after 2 days. As shown in Fig. 4A and B, RsAFP2 considerably reduced the fungal burden in the kidney of infected mice on both administration models at least as efficiently as the standard drug, fluconazole, suggesting that under the conditions used in our study, the peptide controlled candidiasis caused by *C. albicans*.

Plant defensins are potent antimicrobial peptides (26). For instance, the *in vitro* antifungal activity of RsAFP2 was demonstrated by Thevissen and coworkers (1, 26, 27), using *C. albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus*, and *Fusarium solani*. In the present work, this finding was extended using different *Candida* species. Our results indicated that RsAFP2 is nontoxic to mammalian cells and remains active after serum treatment. The predominant *C. albicans* killing potential of RsAFP2, its nontoxicity for mammalian cells, and the fact that

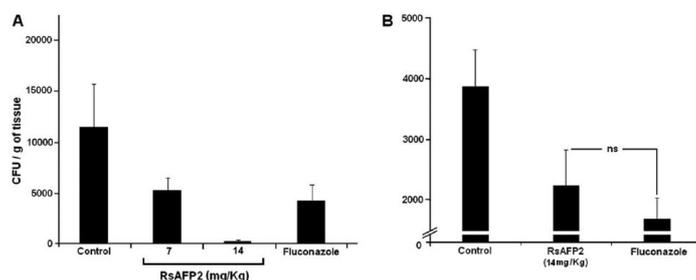


FIG. 4. Activity of RsAFP2 in prophylactic murine models of candidiasis. Infection was performed at 1 h after (A) and 1 h before (B) RsAFP2 treatment. Mice ($n = 5$) were infected intravenously with *C. albicans* (strain 78) and treated with saline (control, $n = 5$), RsAFP2 ($n = 5$), or fluconazole (10 mg/kg) ($n = 5$). CFU counts in the kidneys of one representative experiment (out of three) are shown. Significant statistical differences ($P < 0.01$) were observed between antifungal-treated mice (RsAFP2 and fluconazole) and control mice (saline) in both experiments. Nonsignificant (ns; $P = 0.152$) differences were observed between CFU counts from RsAFP2-treated and fluconazole-treated mice in the prophylactic model. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the local ethics committee and international recommendations.

RsAFP2 can control candidiasis in vivo point to the potential of this defensin as a novel antifungal agent to combat *C. albicans* infections.

The present work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), International Society for Infectious Diseases (ISID), and Small Grants and FWO-Vlaanderen, Belgium (research project to B.P.A.C.). K.T. was supported by a postdoctoral fellowship from K. U. Leuven (industrial research fellow).

We thank Geralda R. Almeida for technical assistance and J6 for helpful discussions. We also thank Daniela Alviano, Sergio Fracalanza, and Allen Hagler for providing strains of *Candida* spp.

REFERENCES

- Aerts, A. M., I. E. Francois, E. M. Meert, Q. T. Li, B. P. Cammue, and K. Thevissen. 2007. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**:243–247.
- Barbosa, F. M., S. Daffre, R. A. Maldonado, A. Miranda, L. Nimrichter, and M. L. Rodrigues. 2007. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anti-yeast agent that acts in synergy with fluconazole. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**:279–286.
- Barns, S. M., D. J. Lane, M. L. Sogin, C. Bibeau, and W. G. Weisburg. 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**:2250–2255.
- Barreto-Bergter, E., M. R. Pinto, and M. L. Rodrigues. 2004. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Cienc.* **76**:67–84.
- Clemons, K. V., and D. A. Stevens. 2001. Efficacy of the partricin derivative SPA-S-753 against systemic murine candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:183–186.
- Collins, B. E., L. J. Yang, and R. L. Schnaar. 2000. Lectin-mediated cell adhesion to immobilized glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **312**:438–446.
- da Silva, A. F., M. L. Rodrigues, S. E. Farias, I. C. Almeida, M. R. Pinto, and E. Barreto-Bergter. 2004. Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. *FEBS Lett.* **561**:137–143.
- Enoch, D. A., H. A. Ludlam, and N. M. Brown. 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* **55**:809–818.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**:497–509.
- Graybill, J. R., L. K. Najvar, J. D. Holmberg, A. Correa, and M. F. Luther. 1995. Fluconazole treatment of *Candida albicans* infection in mice: does in vitro susceptibility predict in vivo response? *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2197–2200.
- Hendriks, L., A. Goris, Y. Van de Peer, J. M. Neefs, M. Vancanneyt, K. Kersters, G. L. Hennebert, and R. De Wachter. 1991. Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1223–1230.
- Leverly, S. B., M. Momany, R. Lindsey, M. S. Toledo, J. A. Shayman, M. Fuller, K. Brooks, R. L. Doong, A. H. Straus, and H. K. Takahashi. 2002. Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. *FEBS Lett.* **525**:59–64.
- MacCallum, D. M., and F. C. Odds. 2004. Need for early antifungal treatment confirmed in experimental disseminated *Candida albicans* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4911–4914.
- Nimrichter, L., E. Barreto-Bergter, R. R. Mendonca-Filho, L. F. Kneipp, M. T. Mazzi, P. Salve, S. E. Farias, R. Wait, C. S. Alviano, and M. L. Rodrigues. 2004. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infect.* **6**:657–665.
- Nimrichter, L., M. D. Cerqueira, E. A. Leitao, K. Miranda, E. S. Nakayasu, S. R. Almeida, I. C. Almeida, C. S. Alviano, E. Barreto-Bergter, and M. L. Rodrigues. 2005. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infect. Immun.* **73**:7860–7868.
- Okawa, Y., M. Miyauchi, S. Takahashi, and H. Kobayashi. 2007. Comparison of pathogenicity of various *Candida albicans* and *C. stellatoidea* strains. *Biol. Pharm. Bull.* **30**:1870–1873.
- Pinto, M. R., M. L. Rodrigues, L. R. Travassos, R. M. Haido, R. Wait, and E. Barreto-Bergter. 2002. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **12**:251–260.
- Ramamoorthy, V., E. B. Cahoon, J. Li, M. Thokala, R. E. Minto, and D. M. Shah. 2007. Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *Mol. Microbiol.* **66**:771–786.
- Rittershaus, P. C., T. B. Kechichian, J. C. Allegood, A. H. Merrill, Jr., M. Hennig, C. Luberto, and M. Del Poeta. 2006. Glucosylceramide is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* **116**:1651–1659.
- Rodrigues, M. L., L. Shi, E. Barreto-Bergter, L. Nimrichter, S. E. Farias, E. G. Rodrigues, L. R. Travassos, and J. D. Nosanchuk. 2007. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**:1372–1376.
- Rodrigues, M. L., L. R. Travassos, K. R. Miranda, A. J. Franzen, S. Rozenental, W. de Souza, C. S. Alviano, and E. Barreto-Bergter. 2000. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* **68**:7049–7060.
- Rogers, T. R. 2006. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**(Suppl. 1):7–11.
- Saito, K., N. Takakuwa, M. Ohnishi, and Y. Oda. 2006. Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:515–521.
- Schnaar, R. L., and L. K. Needham. 1994. Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **230**:371–389.
- Terras, F. R., H. M. Schoofs, M. F. De Bolle, F. Van Leuven, S. B. Rees, J. Vanderleyden, B. P. Cammue, and W. F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **267**:15301–15309.
- Thevissen, K., H. H. Kristensen, B. P. Thomma, B. P. Cammue, and I. E. Francois. 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today* **12**:966–971.
- Thevissen, K., D. C. Warnecke, I. E. Francois, M. Leipelt, E. Heinz, C. Ott, U. Zahring, B. P. Thomma, K. K. Ferket, and B. P. Cammue. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **279**:3900–3905.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)